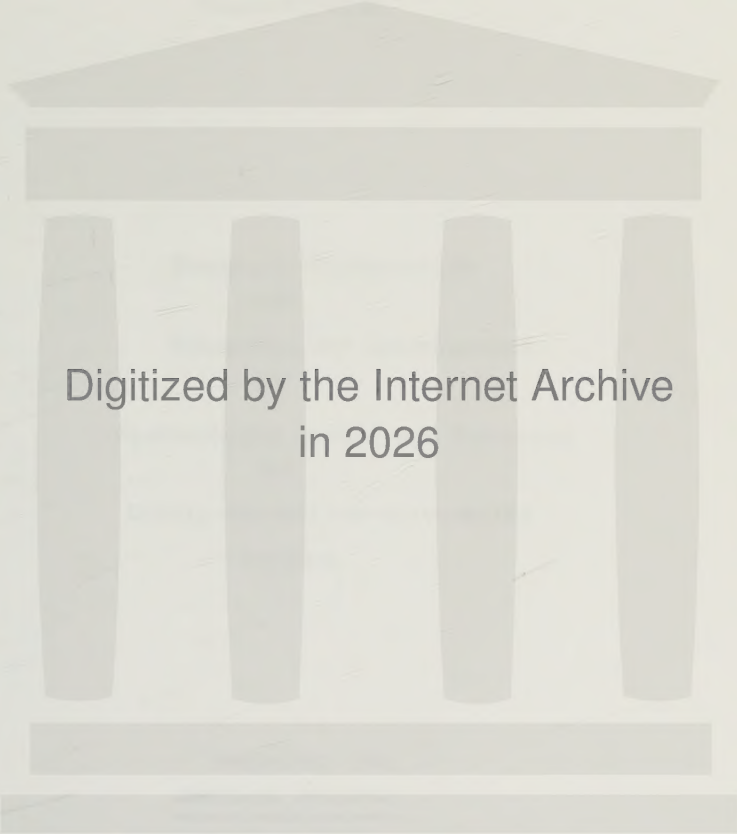


UNTERSUCHUNGEN ÜBER TRANSKRIPTION

Hermann Heumann

1970



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549025_0051

UNTERSUCHUNGEN
ÜBER
TRANSKRIPTION

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilian-Universität
München

vorgelegt von
Hermann Heumann

München 1978



1. Berichterstatter: Professor Dr. W. Zillig

2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Zundel

Tag der mündlichen Prüfung: 25.7.1978

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Professor Dr. W. Zillig am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, durchgeführt.

Herrn Professor Zillig danke ich herzlich für die großzügige Förderung der Arbeit und für die Hilfe durch anregende Diskussionen.

Frau G. Baer und Frau S. Hörlein danke ich für ihre ausgezeichnete technische Hilfe.

Herrn F. Förtsch und den Herren Ries und Neusser danke ich für Ihre Hilfe bei elektronischen und mechanischen Arbeiten zum Bau des Fluoreszenzspektrometers.

Ferner gilt mein Dank Herrn P. Stöckel und Herrn R. May für ihre kritischen Diskussionsbeiträge.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Charakterisierung der Transkriptionsreaktion	1
1.2.	Verwendete physikalische Methoden	2
1.2.1.	Lichtstreuung	3
1.2.2.	Fluoreszenzspektroskopie	3
1.3.	Kurze Zusammenfassung der wichtigsten Kenntnisse über den Transkriptionsprozeß	4
1.3.1.	Vorkommen und Struktur der DNA-abhängigen RNA-Polymerase	4
1.3.2.	Die Rolle der Untereinheiten der RNA-Polymerase	6
1.3.3.	Der Transkriptionszyklus	6
1.3.3.1.	Bindung	7
1.3.3.2.	Initiation	7
1.3.3.3.	Elongation	7
1.3.3.4.	Termination	7
1.3.4.	Transkription an T7-DNA	8
2.	Verfolgung der Transkription durch Lichtstreuung	9
2.1.	Vorbemerkung	9
2.2.	Gleichungen, die für die Ableitung der Zeitabhängigkeit der durch die naszierende RNA verursachten Lichtstreuung gebraucht werden	10
2.2.1.	Der Formfaktor einer Kugel	11
2.2.2.	Der Formfaktor eines Gauß-Knäuels	11
2.2.3.	Der Formfaktor eines Punktstreuers	12
2.3.	Resultate und Diskussion	13
2.3.1.	Der zeitunabhängige Beitrag der Streuung	18
2.3.1.1.	Der Beitrag der DNA	18
2.3.1.2.	Der Beitrag der RNA-Polymerase	19
2.3.2.	Die zeitabhängige Streufunktion	19
2.3.2.1.	Die Streuung der naszierenden RNA im Elongationskomplex	20
2.3.2.1.1.	Die Streuung der naszierenden RNA allein	20
2.3.2.1.1.1.	Der Formfaktor $P(x, t = \tau)$ der fertigen frühen m-RNA des E.coli-Phagen T7	22

2.3.2.1.1.2.	Der Formfaktor $P(t)$ der naszierenden RNA(Kugelmodell)	27
2.3.2.1.1.3.	Der Formfaktor $P(t)$ der naszierenden RNA(Gauß-Knäuel-Modell)	29
2.3.2.1.2.	Der Beitrag zur zeitabhängigen Streuung auf Grund von Interferenzen zwischen der wachsenden RNA und der DNA im Elongationskomplex	30
2.3.2.1.3.	Der Beitrag zur zeitabhängigen Streuung auf Grund von Interferenzen zwischen der RNA und der RNA-Polymerase im Elongationskomplex	36
2.3.2.1.4.	Einfluß des Streumassenradius R der fertigen T7-m-RNA auf den Verlauf der zeitabhängigen Streuung der naszierenden RNA	38
2.3.2.2.	Der zeitliche Verlauf der Streuung über mehr als eine Transkriptionsperiode	40
2.3.3.	Diskussion der Transkriptionskinetik, die durch Lichtstreuungsmessungen erhalten wurden	41
2.3.4.	Probleme bei nicht homogenen RNA-Proben	45
2.3.5.	Aspekte des Mechanismus der Elongation	46
2.3.5.1.	Die Trägheitskraft	47
2.3.5.1.1.	Der Beitrag der DNA bei festgehaltenen P-R-Komplex	47
2.3.5.1.2.	Der Beitrag des P-R-Komplex bei festgehaltener DNA	49
2.3.5.2.	Die Reibungskraft	49
2.3.5.2.1.	Der Beitrag der DNA bei festgehaltenem P-R-Komplex	49
2.3.5.2.2.	Der Beitrag des P-R-Komplexes bei festgehaltener DNA	50
3.	Das Monomer-Dimer-Gleichgewicht der RNA-Polymerase	52
3.1.	Vorbemerkung	52
3.2.	Ableitung der für die Interpretation der Lichtstreuendaten notwendigen Gleichungen	53
3.2.1.	Gültigkeit der Punktstreuernäherung für die RNA-Polymerase	53
3.2.2.	Überlegungen zur Nichtidealität der Lösung	53
3.2.3.	Herleitung der Gleichungen zur Bestimmung der Bindungskonstanten für die Interaktion von Coreenzym mit dem σ -Faktor ($E + \sigma \rightleftharpoons E\sigma$ -Gleichgewicht)	55

3.2.4.	Herleitung der Gleichungen für die Bestimmung der Bindungskonstanten K_D des Monomer-Dimer-Gleichgewichts	56
3.3.	Ergebnisse	59
3.3.1.	Bestimmung der Absorptionskoeffizienten für Holoenzym, Coreenzym und σ -Faktor	59
3.3.2.	Die ionenstärkeabhängige Lichtstreuung von Coreenzym	59
3.3.3.	Titration von Coreenzym mit σ -Faktor bei verschiedenen Ionenstärken	62
3.3.4.	Die Abhängigkeit des Monomer-Dimer-Gleichgewichts von Holoenzym von der Ionenstärke	67
3.3.4.1.	Lichtstreuungsmessungen	67
3.3.4.2.	Neutronenstreuungsmessungen	69
3.3.5.	Abschätzung kinetischer Konstanten des Monomer-Dimer-Gleichgewichts	72
3.3.6.	Einfluß der Inhibitoren Rifampicin und Heparin auf das Monomer-Dimer-Gleichgewicht von Holoenzym	73
3.3.7.	Einfluß der T7-DNA auf das Monomer-Dimer-Gleichgewicht von Holoenzym	73
3.4.	Diskussion	76
4.	Die Bindung von Rifampicin an RNA-Polymerase	80
4.1.	Vorbemerkung	80
4.2.	Herleitung der für die Interpretation der Fluoreszenzmessung notwendigen Gleichungen	81
4.2.1.	Bestimmung der Bindungskonstanten aus den Titrationskurven	81
4.2.2.	Bestimmung der Reaktionskonstanten k_{on}	84
4.3.	Resultate	85
4.3.1.	Bestimmung der Bindungskonstanten	85
4.3.2.	Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten für die Bindung von Rifampicin an $\beta\alpha_2$	90
4.4.	Diskussion	93
5.	Material und Methoden	96
5.1.	Material	96
5.1.1.	RNA-Polymerase	96
5.1.2.	DNA	96
5.1.3.	Inhibitoren	96
5.1.4.	Präparation der RNA aus Rattenleber	96

VI

5.2.	Methoden	97
5.2.1.	Bestimmung des C-Gehaltes von Coreenzym durch Elementar-Analyse	97
5.2.2.	Absorbtionsmessung	97
5.2.3.	Lichtstreuungsmessungen	97
5.2.4.	Transkriptionsexperimente	98
5.2.4.1.	Der radioaktive Einbautest	98
5.2.4.2.	Der Lichtstreutest	98
5.2.5.	Agarosegelelektrophorese(Plattengel) zur Analyse der RNA aus einem Trans- kriptionsansatz	99
5.2.6.	Neutronenstreuungsmessungen	100
5.2.7.	Ermittlung des molaren Extinktions- koeffizienten von Coreenzym, σ -Faktor und Holoenzym	101
5.2.8.	Titrationsexperimente zur Bestimmung der Rifampicinbindung	103
5.2.9.	Fluoreszenzkorrekturen	103
6.	Zusammenfassung	107
	Literaturverzeichnis	111
	Lebenslauf	

Verwendete Abkürzungen

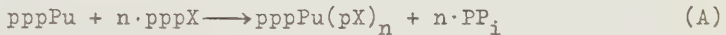
^{14}C	Kohlenstoffisotop 14
Ci	Curie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
T7-DNA	Desoxyribonukleinsäure des Bakteriophagen T7
RNA	Ribonukleinsäure
m-RNA	Boten-RNA
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
UTP	Uridin-5'-triphosphat
RNAase	Ribonuklease
DNAase	Desoxyribonuklease
E	DNA-abhängige RNA-Polymerase, nicht gesättigt mit dem Initiationsfaktor (Minimalenzym)
E σ	Vollenzym, Holoenzym
SDS	Natriumdodecylsulfat
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
Upm	Umdrehungen pro Minute
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-Oxymethyl-aminomethan
Ipm	Impulse pro Minute
λ	Wellenlänge
λ	Impulsübertragungsvektor
E ppr	Partiell Rifampicin resistente RNA-Polymerase
OD	Optische Dichte

1. Einleitung

Die Genexpression, d.h. die Umsetzung genetischer Information in Aminosäuresequenzen, läuft in mehreren Schritten ab. Im ersten Teilprozeß, der Transkription^{1,2)}, wird an der DNA, die die genetische Information als Nukleotidsequenzen verschlüsselt enthält, eine komplementäre RNA-Kopie synthetisiert.

1.1. Charakterisierung der Transkriptionsreaktion

Der Transkriptionsprozeß ist eine von dem Enzym DNA-abhängige RNA-Polymerase katalysierte Heteropolykondensationsreaktion³⁾:



$\text{pppPu}(\text{pX})_n$ ist das Produkt, die RNA. Sie wird aus den Ribonukleosidtriphosphaten ATP, UTP, GTP, CTP (pppX) unter Eliminierung von Pyrophosphat (PP_i) synthetisiert, wobei jede Kette mit einem Purinribonukleosidtriphosphatrest (pppPu) beginnt. Die Transkriptionsreaktion ist in vitro durchführbar, zweiwertige Metallionen (Mg^{++} oder Mn^{++}) und DNA als Matrice sind für den Ablauf der Reaktion (A) notwendig. Die Transkription bei Prokaryonten wird im Unterschied zu anderen Polykondensationsreaktionen von Ribonukleosidtriphosphaten mit Rifampicin gehemmt⁴⁾. Dies ermöglicht ihre Erkennung auch in Rohextrakten und in vivo.

1.2. Verwendete physikalische Methoden

Die bisherigen Erkenntnisse über den Transkriptionsprozeß sind im wesentlichen mit biochemischen Methoden erarbeitet worden. Die wichtigsten dieser Methoden sind der Transkriptionstest, bei dem der Einbau radioaktiv markierter Nukleosidtriphosphate in saureunlösliche Polyribonukleotide bestimmt wird^{1,2)}, und der Filterbindungstest⁸⁶⁾ zur Untersuchung der Polymerase-DNA-Wechselwirkung. Physikalische Methoden wie Röntgenstrukturanalyse, Fluoreszenz- und Absorptionsspektroskopie, CD-Messungen, Licht-, Röntgen- und Neutronenstreuungsmessungen sind möglicherweise geeignet, zusammen mit biochemischen Methoden weiterführende Informationen über den Transkriptionsprozeß zu liefern. Solche Methoden sind für die Untersuchung des Transkriptionsprozesses bisher nur vereinzelt eingesetzt worden: Sedimentationsmessungen zur Bestimmung des Molekulargewichtes der Polymerase^{23,24)}, CD-Messungen um Konformationsänderungen der RNA-Polymerase allein und im Komplex mit der DNA festzustellen^{25,26)}, Röntgenkleinwinkelmessungen zur Untersuchung der Form der Polymerase²⁷⁾ und Fluoreszenzmessungen zur Untersuchung der Rifampicin-Polymerase-Wechselwirkung^{28,29)}.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zu prüfen, ob physikalische Methoden wie Fluoreszenzspektroskopie und Lichtstreuungsmessungen für die systematische Untersuchung des Transkriptionsprozesses geeignet sind. Diese optischen Methoden sind genügend schnell und empfindlich, so daß auch rasch ablaufende Reaktionen ohne Beeinflussung des Systems durch die Messung verfolgt werden können.

1.2.1. Lichtstreuung

Die Methode der Lichtstreuung ist vorteilhaft dann einzusetzen, wenn drastische Molekulargewichtsänderungen verfolgt werden, z.B. Aggregationen. Je größer die zu untersuchenden Moleküle sind, desto empfindlicher ist diese Methode. Sie liefert Informationen nicht nur über die Bindungsparameter von Molekülen sondern auch über deren Strukturparameter.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wird die Anwendbarkeit der Lichtstreuungsmethode zur kontinuierlichen Verfolgung der RNA-Synthese aufgezeigt, im zweiten wird die Lichtstreuung als Signal zur Untersuchung des Monomer-Dimer-Gleichgewichts der DNA-abhängigen RNA-Polymerase benutzt.

1.2.2. Fluoreszenzspektroskopie

Tragen Proteine fluoreszierende Gruppen, entweder künstlich eingeführte kovalent gebundene Reportergruppen oder natürlich vorhandene Tryptophanreste, so kann aus einer Fluoreszenzänderung bei Zugabe eines mit dem Protein reagierenden Moleküls die Komplexkonzentration quantitativ bestimmt werden, (Konzentrationsbereich $10^{-6}M - 10^{-9}M$), wenn sich das Fluoreszenzsignal im gebundenen und freien Zustand genügend unterscheidet (mindestens 5%). Zusätzlich noch kann die Fluoreszenzspektroskopie Informationen liefern über Konformationsänderungen der bei der Reaktion beteiligten Moleküle. Auf diese Weise ist es möglich, Information über den Mechanismus einer Reaktion zu bekommen.

Im dritten Teil der Arbeit wird anknüpfend an die Untersuchungen von Mehrli⁷³⁾, Behr et al.²³⁾ und Wu²⁹⁾ die Bindung von Rifampicin an RNA-Polymerase, den Partialkomplex β_{α_2} die Untereinheit β und partiell Rifampicin resistente RNA-Polymerase durch Fluoreszenzmessungen untersucht.

1.3. Kurze Zusammenfassung der wichtigsten Kenntnisse über den Transkriptionsprozeß

Bevor in den Abschnitten 2,3 und 4 gezeigt wird, wo physikalische Methoden zur Untersuchung des Transkriptionsprozesses eingesetzt werden können, sollen im folgenden Abschnitt die wichtigsten Kenntnisse über die Transkription in vitro skizziert werden.

1.3.1. Vorkommen und Struktur der DNA-abhängigen RNA-Polymerase

Aus zahlreichen prokaryontischen Organismen wurden RNA-Polymerasen mit Molekulargewichten zwischen 400000 und 500000⁵⁾ isoliert. Das am besten charakterisierte Enzym ist das aus E.coli, mit dem sich auch die vorliegende Arbeit befaßt. RNA-Polymerasen aus verschiedenen Spezies von Prokaryonten zeigen analoge Zusammensetzung aus Untereinheiten, nämlich $\beta'\beta\alpha_2$ für Coreenzym bzw. $\beta'\beta\alpha_2\sigma$ für Holoenzym. Die Molekulargewichte der Untereinheiten wurden unter anderem durch Acrylamid-Gelelektrophorese nach Denaturierung durch SDS und Mercaptoethanol bestimmt⁶⁾ (Fig.1, Tab.1). Mikropräparativ können die Untereinheiten durch Elektrophorese auf Zelluloseazetatstreifen in Gegenwart von 6M Harnstoff getrennt werden^{7,8,9)} (Fig.2) getrennt werden.

Tab. 1 Molekulargewichte der Untereinheiten der DNA-abhängigen RNA-Polymerase

Untereinheit	Molekulargewicht
β'	160000
β	155000
σ	92000
α	40000

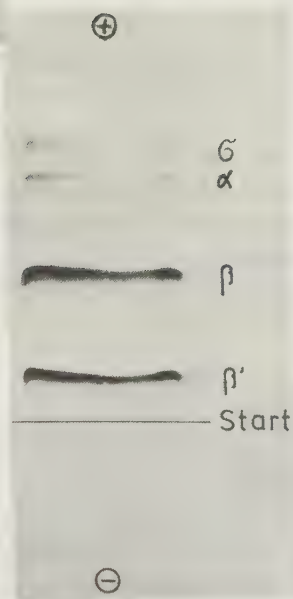


Fig. 1

SDS Acrylamidgel:
 Holoenzym (Spur 1)
 rekonstituiert aus
 Coreenzym (Spur 2)
 und σ (Spur 4).
 Spur 3: Partial-
 komplex $\beta\alpha_2$
 Spur 5: α
 Spur 6: β'
 Spur 7: β

Fig. 2

Elektrophoretische Trennung
 der Untereinheiten von RNA-
 Polymerase in Gegenwart von
 6 M Harnstoff auf Zellulose
 azetatstreifen.



1.3.2. Die Rolle der Untereinheiten der RNA-Polymerase

Es gibt eine Reihe genetischer und biochemischer Hinweise, die zeigen, daß alle oben genannten Untereinheiten für die normale Funktion der DNA-abhängigen RNA-Polymerase notwendig sind. Die Funktionsanalyse mutanter RNA-Polymerasen und die Untersuchung der Funktion isolierter Untereinheiten bzw. von Partialkomplexen haben einige Hinweise auf die Funktion der Untereinheiten geliefert, die im folgenden zusammengefaßt sind:

1.3.2.1. Die Untereinheit β' ist wahrscheinlich für die Bindung der RNA-Polymerase an die DNA verantwortlich.^{10), 11), 12)}

1.3.2.2. Die Untereinheit β trägt die Bindungsstelle für die spezifischen Transkriptionsinhibitoren Rifampicin¹⁹⁾ und Streptolydigin⁹⁾. Es gibt Hinweise, daß β an der Bindung des σ -Faktors¹⁵⁾ und an der Substratbindung beteiligt ist^{16, 17)}.

1.3.2.3. Die Untereinheit α hat einen Bindungsplatz für β ^{13, 14)} und ist möglicherweise bei der Promotorerkennung beteiligt¹⁸⁾.

1.3.2.4. Die Untereinheit σ ist für die korrekte Initiation am Promotor doppelsträngiger DNA notwendig. Im Elongationskomplex wird σ abgespalten und kann dann wieder mit freiem Coreenzym zum Holoenzym zusammentreten. Es hat also in der Initiation der Transkription eine katalytische Funktion²⁰⁾.

1.3.3. Der Transkriptionszyklus

Die DNA-abhängige RNA-Synthese nach Gleichung (A) kann in vier Abschnitte eingeteilt werden²¹⁾:

1.3.3.1. Bindung

Die RNA-Polymerase (Holoenzym) kann selektiv eine DNA-Sequenz, den Promotor, als Bindungsort erkennen. Hier beginnt die Synthese der RNA-Kette. Der Promotor muß sowohl das Erkennungssignal für die Initiation enthalten, als auch die Information, welcher der beiden antiparallelen DNA-Stränge als codogener Strang transkribiert wird.

1.3.3.2. Initiation

Die Polymerase katalysiert die Kondensation von ATP oder GTP mit einem weiteren Ribonukleosidtriphosphat, wobei Pyrophosphat abgespalten wird. Durch Rifampicin wird die weitere Kettenverlängerung verhindert. Das Dinukleosidtetraphosphat pppPupX wird unter dieser Bedingung kontinuierlich synthetisiert²²⁾.

1.3.3.3. Elongation

An das 3'OH Ende des Dinukleosidtetraphosphates werden unter Abspaltung von Pyrophosphat aus den Substraten, den Nukleosidtriphosphaten, nacheinander Nukleosidmonophosphatreste ankondensiert. Diese Reaktion wird durch das Coreenzym katalysiert. Die Reihenfolge der Nukleosidreste in der RNA-Kette wird bestimmt durch die Sequenz der komplementären Nukleotide des codogenen Strangs der DNA.

1.3.3.4. Termination

Die Termination, die Beendigung der Synthese einer RNA-Kette, findet an einer speziellen Nukleotidsequenz auf der DNA, dem Terminator, statt. Auch in vitro kann der Transkriptionsprozeß bei hoher Ionenstärke zyklisch ablaufen. Dabei dissoziiert der Transkriptionskomplex nach Termination in seine Bestandteile RNA, RNA-Polymerase und DNA. Die Polymerase ist somit wieder frei für den nächsten Zyklus. Bei niedriger Ionenstärke wird im wesentlichen nur ein einziger Zyklus durchgelaufen (sog. Plateaukinetik).

1.3.4. Transkription an T7-DNA

Für Untersuchungen des Mechanismus der Transkription in vitro mit RNA-Polymerase aus E.coli ist die DNA von E. coli Phagen eine besser geeignete Matrize als die spezieisene DNA: E.coli-RNA-Polymerase transkribiert mit großer Effizienz die frühen Gene der Phagen-DNA ohne zusätzliche Proteinfaktoren, wie sie für die Transkription von E.coli-Gene notwendig sind. Gut untersucht ist die Transkription an T7-DNA, die auch in der vorliegenden Arbeit als Matrize Verwendung fand. Sowohl bei hoher Ionenstärke, bei der Reinitiation möglich ist, als auch bei niedriger Ionenstärke, wo der Transkriptionszyklus im wesentlichen nur einmal durchlaufen wird, werden die ersten 20% der T7-DNA mit großer Effizienz transkribiert. Das Molekulargewicht der frühen m-RNA des Phagen T7 wurde durch Sedimentationsmessungen bestimmt. Es ist $2.2 \cdot 10^6$ 42,43). In Fig. 5a und 5b sind Agarosegele gezeigt, auf denen die T7-m-RNA und zum Vergleich r-RNA aus Rattenleber elektrophoretisch analysiert sind.

2. Verfolgung der Transkription durch Lichtstreuung

2.1. Vorbemerkung

Obwohl mit dem konventionellen Transkriptionstest, der Festimmung des Einbaus radioaktiv markierter Nukleotidreste in die RNA^{1,2)}, eine Reihe wichtiger Informationen über das Transkriptionsgeschehen gewonnen wurden, hat er doch gewisse Nachteile:

- a) Die Kinetik der RNA-Synthese kann mit dieser Methode nur Punkt für Punkt verfolgt werden. Gerade um geringe oder schnelle Änderungen der Transkriptionsraten bestimmen zu können, wäre eine kontinuierliche Methode vorteilhaft.
- b) Für die Bestimmung der Menge synthetisierter RNA nach der herkömmlichen Methode sind mehrere Arbeitsschritte nötig. Eine direktere Methode würde die bei jedem einzelnen Schritt möglichen Fehler vermeiden. Mit einer Methode bei der das Ergebnis der Messung unmittelbar verfolgt werden kann, kann der Transkriptionsprozeß an definierten Punkten der Kinetik unterbrochen werden, um den Transkriptionsansatz z.B. bezüglich der RNA-Produkte zu analysieren.
- c) Die punktweise Aufnahme der Transkriptionskinetik erfordert relativ große Mengen an wertvollem Material wie radioaktiv markierten Nukleosidtriphosphaten, RNA-Polymerase und DNA. Die zur Bestimmung der einzelnen Punkte verwendeten Proben sind verloren. Eine kontinuierliche Methode dagegen, bei der an ein und derselben Probe die ganze Kinetik aufgenommen werden kann, wäre materialsparender.

Im folgenden wird über Versuche berichtet, die Transkription durch Lichtstreuungsmessung zu verfolgen. Der durch die wachsende RNA-Kette verursachte Anstieg der Streuintensität ist ein direktes Signal zur kontinuierlichen Verfolgung der RNA-Synthese. Diese Messungen können in jedem Spektrometer durchgeführt werden, das als Lichtstreugerät geeignet ist, z.B. in einem Fluorimeter.

2.2. Gleichungen, die für die Ableitung der Zeitabhängigkeit der Lichtstreuung verursacht durch die naszierende RNA gebraucht werden

Allgemeine Einführungen in die Lichtstreuungstheorie werden in einer Reihe von Büchern angeboten^{30,31,32,33}). Hier soll nur ein kurzer Abriss der wichtigsten Gleichungen gegeben werden, die zum Verständnis der folgenden Ableitungen notwendig sind. Die Grundgleichung, die die Streuintensität I als Funktion des Impulsübertragungsvektors $\mathcal{K}$ ausdrückt, heißt:

$$I(\mathcal{K}) = K \cdot (1 + \cos^2 \vartheta) \cdot M^2 \cdot c \cdot P(\mathcal{K}) \quad (1)$$

mit

$$\mathcal{K} = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \frac{\vartheta}{2}$$

$$K = \frac{n_0}{\lambda^4} \left(\frac{\partial n}{\partial c} \right)^2 ; \quad \frac{1}{M^2} = \frac{1}{M^2} + 2Bc + 2CcM$$

ϑ ist der Streuwinkel

c ist die molare Konzentration der beobachteten Streupartikel.

n_0 ist der Brechungsindex des Lösungsmittels.

$\partial n / \partial c$ ist das Brechungsindexincrement der gelösten Teilchen.

λ ist die Wellenlänge.

M ist das Molekulargewicht der Teilchen.

B, C sind der zweite und dritte Virialkoeffizient, die die Nichtidealität der gelösten Teilchen berücksichtigen. Für genügend verdünnte Lösungen können diese Koeffizienten vernachlässigt werden.

$P(\mathcal{K})$ ist der Formfaktor der streuenden Teilchen.

Nach Debye³⁴⁾ kann der Formfaktor $F(\mathcal{X})$ allgemein durch die folgende Gleichung ausgedrückt werden:

$$F(\mathcal{X}) = \frac{i}{N^2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{\sin(\mathcal{X} r_{ij})}{\mathcal{X} r_{ij}} \quad (2)$$

wobei die Summation über alle N streuenden Elemente innerhalb des einzelnen Partikels geht.

Im folgenden werden einige spezielle Formfaktoren angegeben.

2.2.1. Der Formfaktor einer Kugel

Wie im nächsten Kapitel gezeigt wird, kann die RNA näherungsweise als Kugel beschrieben werden. Der Formfaktor $F(\mathcal{X})$ ³⁵⁾ einer Kugel mit dem Radius r ist nach Ausführung der Summation in Gleichung (2):

$$F(\mathcal{X})_{\text{Kugel}} = \left(3 \cdot \frac{\sin(\mathcal{X}r) - \mathcal{X}r \cos(\mathcal{X}r)}{(\mathcal{X}r)^3} \right)^2 \quad (3)$$

2.2.2. Der Formfaktor eines Gauß-Knäuels

Die T7-DNA kann als Gauß-Knäuel betrachtet werden⁵²⁾. Solch ein Knäuel besteht aus N aneinandergereihten Stäbchen der Länge $2a$, deren Richtung bezogen auf die Richtung des vorhergehenden Stäbchens einer Gaußverteilung gehorcht. a ist die Persistenzlänge^{36,37,38)}. Das Gauß-Knäuel hat eine Gesamtlänge von $L = 2aN$, sein Formfaktor ist^{39,40,41)}:

$$P(\mathcal{X})_{\text{Knäuel}} = \frac{1}{N^2} \sum_{i=1}^N e^{-\frac{2}{3} \mathcal{X}^2 a^2} \quad (4a)$$

Nach Summation über alle N Stäbchen ergibt sich:

$$P(x)_{\text{Knäuel}} = \frac{2}{S(x)^2} (e^{-S(x)} + S(x) - 1) \quad (4b)$$

mit

$$S(x) = \frac{2}{3} x^2 \cdot a^2 \cdot N$$

2.2.3. Der Formfaktor eines Punktstreuers

Haben die beobachteten Teilchen einen mittleren Durchmesser von $1/15$ oder weniger der gewählten Wellenlänge, können sie als Punktstreuer³⁰⁾ mit nahezu konstantem $P(x)$ im gesamten x -Bereich betrachtet werden, d.h. es gilt:

$$\lim_{x \rightarrow 0} P(x) = 1$$

Eine Wellenlänge von 350 nm beschränkt die Gültigkeit dieser Näherung auf Partikel mit einer Ausdehnung von weniger als 23 nm.

2.3. Resultate und Diskussion

In den Fig. 3 - 5 werden Kinetiken der RNA-Synthese bei niedriger Ionenstärke, bei der der Transkriptionszyklus nur einmal durchlaufen wird, und bei hoher Ionenstärke, bei der die Transkription zyklisch abläuft, für verschiedene Enzym/DNA-Verhältnisse unter Verwendung von 3 verschiedenen Methoden gezeigt: erstens Bestimmung des Einbaus radioaktiv markierter Nukleotidreste in die säureunlösliche RNA, zweitens Verfolgung der durch die wachsende RNA verursachten Lichtstreuung und drittens, Analyse der RNA auf einem Agarosegel.

Ein Vergleich der Kurven, die durch Bestimmung der Lichtstreuung bzw. der Radioaktivität in Abhängigkeit von der Zeit (s. Fig. 3 und Fig. 4) erhalten wurden, zeigt, daß beide Methoden im Rahmen der Meßfehler gleiche Ergebnisse liefern.

Die Analyse der Größe der T7-m-RNA auf einem Agarosegel in Fig. 5 in Abhängigkeit von der Zeit zeigt, daß bei niedriger Ionenstärke nach ca. 2 min. die T7-m-RNA mit dem Molekulargewicht von $2.2 \cdot 10^6$ fertig ist. Diese Zeit korrespondiert mit dem Knickpunkt der durch Lichtstreuungsmessung ermittelten Transkriptionskinetik bei niedriger Ionenstärke.

Die Radioaktivität ist direkt proportional zur Menge der synthetisierten RNA. Die Lichtstreuung dagegen setzt sich aus der Streuung aller Komponenten der Inkubationsmischung wie DNA, RNA-Polymerase, RNA in statu nascendi und nach Freisetzung vom Transkriptionskomplex zusammen.

In Fig. 3 und Fig. 4 ist der zeitabhängige Beitrag der Streuung gezeigt, der sich nach Subtraktion der zeitunabhängigen Streuung von der Gesamtstreuung ergibt.

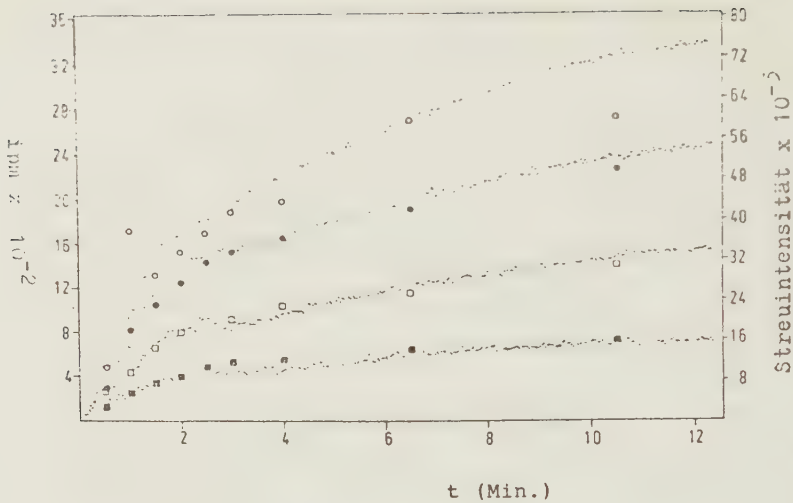


Fig. 3

Transkriptionskinetiken bei niedriger Ionenstärke gemessen mit Lichtstreuung bzw. durch Bestimmung des Einbaus von radioaktiv markiertem ATP mit einer spezifischen Aktivität von 1 Ci/Mol (^{14}C). Das molare Enzym/DNA-Verhältnis variiert von 1 bis 4.

Radioaktivitätsmessungen: 1 ($\blacksquare$), 2 ($\square$), 3 ($\bullet$), 4 ($\circ$), Enzymmoleküle/DNA-Molekül. Die dazu korrespondierenden Lichtstreuintensitäten (---) gemessen als Photonenimpulse sind in Intervallen von 3 sec. bei einem Winkel von $\vartheta = 90^\circ$ und einer Wellenlänge $\lambda = 350 \text{ nm}$ bestimmt. Die Skala für die Lichtstreuung ist so gewählt, daß die durch die Radioaktivitätsbestimmung gemessene Kinetik Kurve 2 ($\square$) die Lichtstreudaten optimal anpaßt.

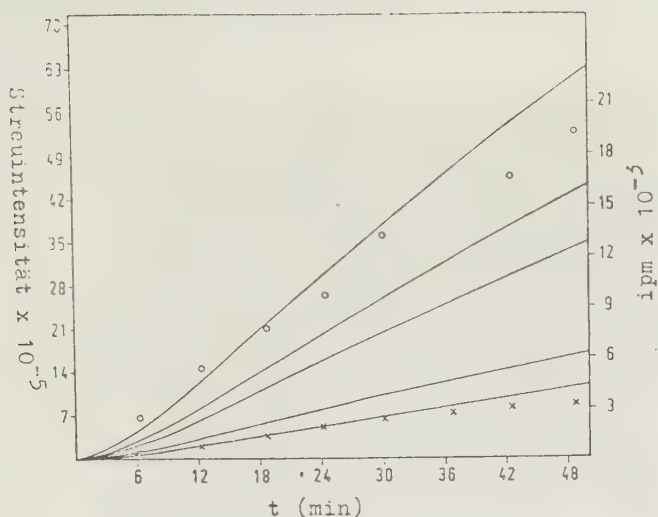


Fig. 4

Transkriptionskinetiken bei hoher Ionenstärke, d.h. unter Reinitiationsbedingungen gemessen mit Lichtstreuung (—) in Intervallen von 3 sec. mit molarem Enzym/DNA-Verhältnissen von 1, 1.8, 2.5, 3.2 und 5 (von unten nach oben) und durch Bestimmung des Einbaus von radioaktiv markiertem ATP mit einer spezifischen Aktivität von 0.1 Ci/Mol (^{14}C) bei molaren Enzym/DNA-Verhältnissen von 1 (x) und 5 (o).

Die Skala für die Lichtstreuung bezüglich der Radioaktivitätsbestimmung ist die gleiche wie die, die für die Messungen bei niedriger Ionenstärke in Fig. 3.



Fig. 5a

Gelelektrophorese der bei niedriger Ionenstärke bei einem molaren Enzym/DNA-Verhältnis von 3 synthetisierten T7-m-RNA auf einem 1% igen Agarosegel. Spur 2 - 7 zeigt Proben, die nach einer Inkubationsdauer von 30 sec., 60 sec., 100 sec., 140 sec., 240 sec. und 600 sec. entnommen wurden. Spur 1 und 8 zeigt r-RNA aus Rattenleber als Referenz. Die Molekulargewichte der r-RNA sind $1.8 \cdot 10^6$ (28 S), $6.9 \cdot 10^5$ (18 S) und $4 \cdot 10^4$ (5 S) ⁹³). Die RNA wurde mit Ethidiumbromid gefärbt. Die niedermolekularen Teilchen sind DNA-Stücke, die nicht völlig hydrolysiert wurden (s. Material und Methoden).

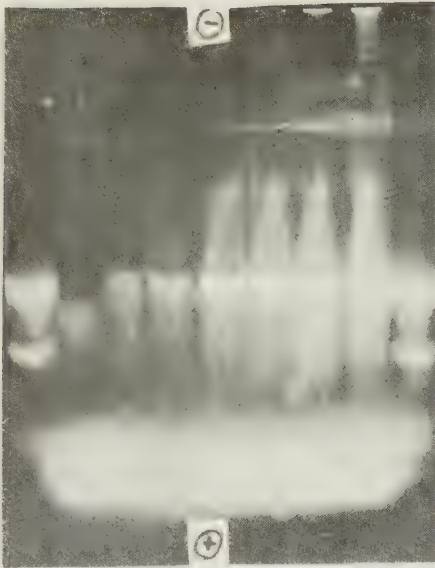


Fig. 5b

Gelelektrophorese der bei hoher Ionenstärke bei einem molaren Enzym/DNA-Verhältnis von 3 synthetisierten T7-m-RNA. Spur 2 - 7 zeigt Proben, die nach einer Inkubationsdauer von 1 min., 2 min., 4 min., 8 min., 20 min., 30 min. und 40 min. entnommen wurden. Spur 1 und 8 zeigt r-RNA aus Rattenleber als Referenz.

1. Der zeitunabhängige Beitrag der Streuung

Die zeitunabhängige Streuung, verursacht durch die DNA und die RNA-Polymerase verschlechtert das Signal- zu Rausch-Verhältnis und nimmt somit Einfluß auf die Genauigkeit der zeitabhängigen Streuintensität.

2.3.1.1. Der Beitrag der DNA

Die T7-DNA hat ein Molekulargewicht von $25 \cdot 10^6$ (47). Sie streut zum Winkel $\varphi = 0$ 100mal stärker als die 10 mal leichtere fertige T7-m-RNA. Die Winkelabhängigkeit der Streuung der T7-DNA ist in Fig.6 gezeigt. Die Streuung nimmt, wie für

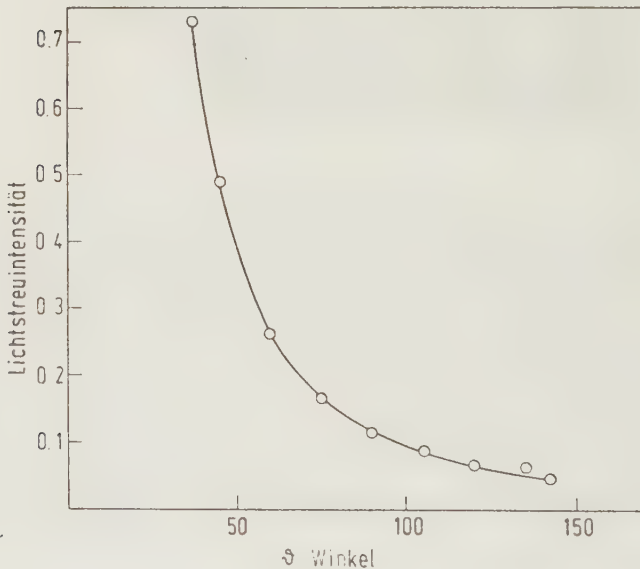


Fig. 6

Die Streuung von T7-DNA ($c = 0.2$ mg/ml) in Abhängigkeit vom Winkel φ .

ein Gnuß-Knauel mit einer Persistenzlänge von 50 nm⁴⁵⁾ zu erwarten ist, mit wachsendem Winkel entsprechend Gleichung (4a) stark ab. Die Streuung der m-RNA des Phagen T7 dagegen ist, wie später (in Fig.8) gezeigt wird, viel weniger stark winkelabhängig.

Auf Grund der unterschiedlichen Winkelabhängigkeit der Streuung ist bei den gewählten Bedingungen, dem Beobachtungswinkel $\varphi = 90^\circ$ und der Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes $\lambda = 350\text{nm}$, die molare Streuung der T7-DNA nur noch 9' mal so groß wie die der fertigen m-RNA.

2.3.1.2. Der Beitrag der RNA-Polymerase

Die molare Streuung der RNA-Polymerase ist wie die Messung zeigt, bei $\varphi = 90^\circ$ und $\lambda = 350\text{ nm}$ ungefähr ebenso groß wie die der m-RNA.

Die Untergrundstreuung von DNA und RNA-Polymerase erhöht das Rauschen der zeitabhängigen Streuung um einen Faktor von ca. 3.

2.3.2. Die zeitabhängige Streufunktion

Die Streuintensität der Nukleosidtriphosphate ist vernachlässigbar. Konzentration, Form und Molekulargewicht der RNA sind somit die einzigen sich in der Zeit ändernden Größen.

Die zeitabhängige Streuung $I(\lambda, t)$ der RNA setzt sich aus zwei Termen additiv zusammen, der Streuung der fertigen RNA in freiem Zustand $I(\lambda, t)_f$ und der Streuung der naszierenden RNA $I(\lambda, t)_n$:-

$$I(\lambda, t) = I(\lambda, t)_f + I(\lambda, t)_n$$

Die Zeitabhängigkeit der Streuintensität $I(\chi, t)$ wird durch die Größe $c(t)$, die Konzentration an fertiger RNA bestimmt. $c(t)$ kann eine komplizierte Funktion der Zeit sein, denn sie hängt vom Grad der Synchronie der transkribierenden Polymerasemoleküle ab. Bei total asynchroner Transkription ist $c(t)$ proportional der Zeit, bei völliger Synchronie eine Treppenfunktion, die jeweils nach der Zeit $t = \tau$, die einer Transkriptionsrunde entspricht, proportional zur Menge der neusynthetisierten RNA ansteigt. Der zeitliche Verlauf über mehr als einen Transkriptionszyklus wird im Detail in Kapitel 2.3.2.2. diskutiert.

2.3.2.1. Die Streuung der naszierenden RNA im Elongationskomplex

Die zeitabhängige Streuung der wachsenden RNA setzt sich aus drei Beiträgen zusammen:

Die wachsende RNA allein liefert den Hauptbeitrag zur zeitabhängigen Streuung. Da die RNA während der Elongation an DNA und RNA-Polymerase gebunden ist, gibt es Interferenzen zwischen diesen Molekülen. Diese Interferenzterme tragen ebenfalls zur zeitabhängigen Streuung bei.

2.3.2.1.1. Die Streuung der wachsenden RNA allein

Zunächst wird die Streuung $I(\chi, t)_n$ der naszierenden RNA ohne Berücksichtigung der Interferenzen mit DNA und RNA-Polymerase innerhalb einer Transkriptionsrunde (von etwa 2 min.) unter der Annahme totaler Synchronie abgeleitet werden. In diesem Fall ist die Konzentration an RNA-Molekülen konstant. Die Zeitabhängigkeit der Streuung wird durch die Größen $M(t)$ und $P(\chi, t)$ beschrieben. Aus Gleichung (1) ergibt sich somit die Streuung der naszierenden

RNA $I(\chi, t)_n$:

$$I(\chi, t)_n \sim M(t)^2 \cdot P(\chi, t) \quad (5)$$

Das Molekulargewicht der naszierenden RNA kann unter der Annahme einer linearen Zunahme mit der Zeit durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$M(t) = m \cdot v \cdot t \quad (6)$$

wobei m das durchschnittliche Molekulargewicht eines Nukleotidrestes ist und v die Kettenwachstumsrate (d.h. die Zahl der Nukleotidreste, die pro Zeiteinheit und Kette eingebaut werden) und $t \leq \tau$.

Über den Formfaktor $P(\chi, t)_n$ der naszierenden RNA gibt es keine unmittelbare Information. Es ist jedoch eine Abschätzung möglich, wenn der Formfaktor der fertigen RNA

$P(\chi, t = \tau)_f$ bekannt ist. Unter der Annahme, daß die fertige und die naszierende RNA im mathematischen Sinn ähnliche Körper sind, erhält man $P(\chi, t)_n$ aus einer Transformation von $P(\chi, t = \tau)_f$ von der Zeit τ auf die Zeit t .

Diese Annahme bezüglich der Ähnlichkeit von fertiger und naszierender RNA kann aber noch eingeschränkt werden:

Je kleiner die RNA-Moleküle sind, desto weniger haben Abweichungen von der geforderten Ähnlichkeit Einfluß auf den Formfaktor der naszierenden RNA. Denn je kleiner das streuende Molekül ist, desto eher nähert sich $P(\chi)$ dem Wert 1 (Punktstreuer).

2.3.2.1.1.1. Der Formfaktor $P(\alpha, t=\tau)_f$ der fertigen frühen m-RNA des E.coli-Phagen T7

Die frühe m-RNA des Phagen T7 besitzt ein Molekulargewicht von $2.2 \cdot 10^6$ ⁴²⁾. Sie wird in vitro mit hoher Effizienz synthetisiert ⁴³⁾ (s.Fig.5). Den Formfaktor $P(\alpha, t=\tau)_f$ kann man aus der Streufunktion $I(\alpha, t=\tau)_f$ der m-RNA ableiten. Da es technisch schwierig ist, genügend große Mengen an intakter T7-m-RNA aus einem in vitro Transkriptionsansatz für die Bestimmung der Streufunktion zu isolieren, wurde $I(\alpha, t=\tau)_f$ auf folgende Weise bestimmt:

Die Streuintensität eines Transkriptionsansatzes mit DNA, RNA-Polymerase und RNA in statu nascendi und nach Freisetzung vom Transkriptionskomplex wurde in Abhängigkeit vom Winkel und von der Zeit bei hoher Ionenstärke, so daß Reinitiation möglich war, gemessen (s.Fig.7). Unter diesen Bedingungen ist, wie später noch diskutiert wird, abgesehen von einer Anfangsphase, die Transkription total asynchron und die RNA-Syntheserate zeitlich konstant, so daß sich Menge und Größenverteilung der naszierenden RNA-Moleküle zeitlich nicht ändern. Durch Differenzbildung von zwei Streukurven, die zum Zeitpunkt $t_1 = 21$ min. und $t_2 = 48$ min. gemessen wurden, wurde die zu beiden Zeitpunkten konstante Streuung von DNA, RNA-Polymerase und naszierender RNA eliminiert. Übrig bleibt die Streuung derjenigen RNA-Moleküle, die während des Zeitintervalls $\Delta t = t_2 - t_1$ synthetisiert wurden und frei in Lösung sind. Fig. 8 zeigt solche Streukurven des Transkriptionsansatzes nach 21 min. bzw. 48 min. Inkubationsdauer. In Fig.9 ist der Logarithmus der Differenz der Streukurven, $I(\alpha)_f$, in Abhängigkeit von α^2 dargestellt. Aus der Steigung dieser Kurve (Guinier-Plot) ⁴⁴⁾ erhält man den Streumassenradius R, den charakteristischen Parameter eines diffusen Streusystems. Für die frühe m-RNA des Phagen T7 ist $R = 47 \text{ nm} \pm 4 \text{ nm}$.

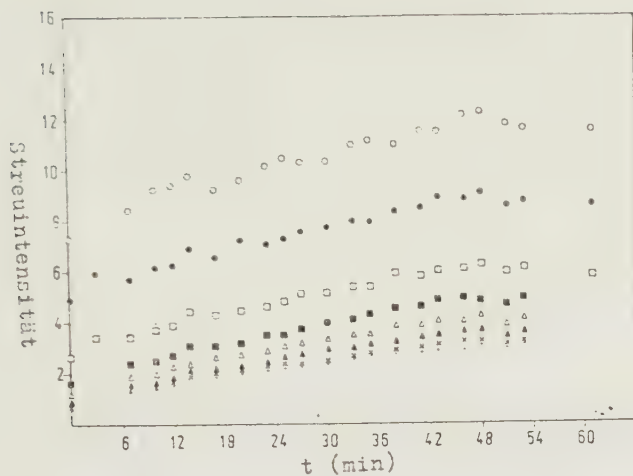


Fig. 7

Kinetik der Synthese der frühen T7-RNA unter Reinitiationsbedingungen mit 2.5 Enzymmolekülen/DNA-Molekül gemessen durch Lichtstreuung bei verschiedenen Winkeln: o : 37.5° ; • : 45° ; □ : 60° ; ■ : 75° ; △ : 90° ; ▲ : 105° ; x : 120° ; • : 135°;

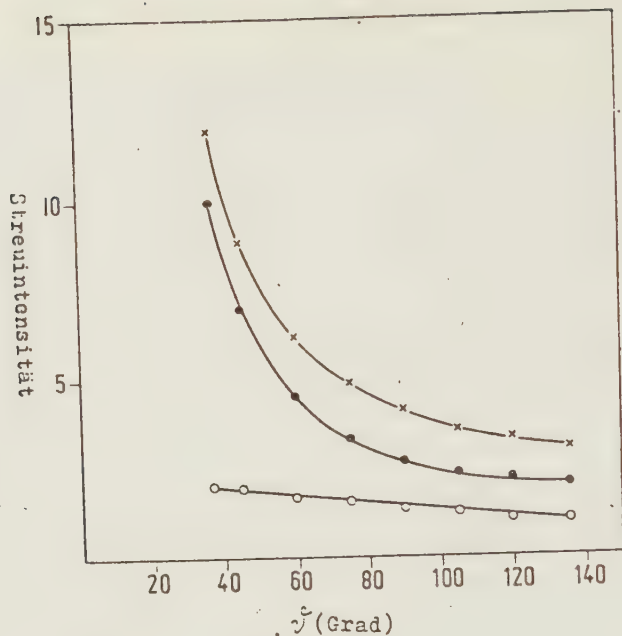


Fig. 8

Winkelabhängigkeit der Streuung der T7-m-RNA gemessen bei $t_2 = 48$ min (x-x-x) und $t_1 = 21$ min (●-●-●) aus Fig. 7. Die Differenz der beiden Kurven (○-○-○) repräsentiert die Streuung der RNA-Moleküle, die im Zeitintervall $\Delta t = t_2 - t_1$ synthetisiert wurden.

Der Guinier-Plot wurde für Differenzstreu曲ven bei verschiedenen λ , d.h. für verschiedene RNA-Konzentrationen aufgenommen. Da keine Konzentrationsabhängigkeit des Streumassenradius innerhalb der Fehlergrenzen gefunden werden konnte, kann in Gleichung (5) $\bar{M}(\lambda)$ durch $M(\lambda)$ ersetzt werden, d.h. die Virialkoeffizienten können näherungsweise null gesetzt werden:

$$\bar{M}(\lambda) = M(\lambda) \quad (7)$$

Der Formfaktor $P(\lambda, t = \tau)_f$ der fertigen RNA kann aus den Streudaten nicht direkt ausgerechnet werden. Man kann jedoch versuchen, die Daten durch gerechnete Modellkurven anzupassen. Solche theoretischen Streukurven sind in Fig. 9 gezeigt. Sie wurden berechnet durch Einsetzen verschiedener Formfaktoren in Gleichung (5). Die Daten wurden am besten angepaßt durch eine Kugel mit dem Radius $r = 60$ nm oder durch ein Gauß-Knäuel mit einer Länge von $L = 2a_N = 2600$ nm (20% der Länge der T7-DNA ($L_{DNA} = 1.3 \cdot 10^4$ nm⁴⁵)) und einer Persistenzlänge von 4 nm.

Durch Lichtstreuung kann zwischen den beiden Modellen nicht unterschieden werden (s. Fig. 9), da die Daten für beide Modelle gleich gut passen. Das spielt jedoch keine wesentliche Rolle, da die zeitabhängige Streufunktion für beide Modelle sehr ähnlich ist (s. Kapitel 2.3.2.1.1.3.).

Die Streukurve $I(\lambda, t = \tau)_f$ der fertigen T7-m-RNA wurde bei hoher Ionenstärke (0.03 M MgCl und 0.13 M KCl) durch Differenzbildung von Streukurven von verschieden lang inkubierten Transkriptionsansätzen bestimmt. Bei niedriger Ionenstärke (0.007 M MgCl und 0.05 M KCl) ist dieses Verfahren nicht möglich, da

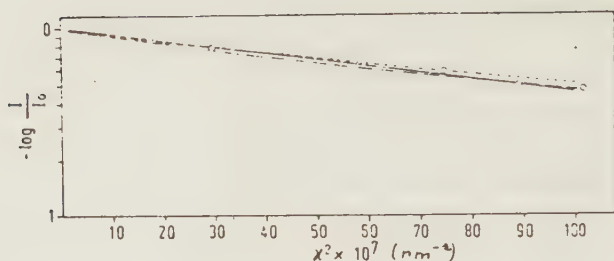


Fig. 9

Guinier-Darstellung der Intensitätsdifferenz (o) aus Fig. 8. Die Daten wurden mit gerechneten Streukurven durch eine Kugel mit dem Radius $r = 60$ nm (—) und durch ein Gauß-Knäuel mit einer Persistenzlänge von $a = 3.5$ nm (---) bzw. $a = 4$ nm (— — —) angepaßt.

die für die Messungen vorausgesetzte steady state-Bedingung für die RNA-Synthese nicht erfüllt ist. Um zu prüfen, ob der bei hoher Ionenstärke bestimmte Streumassenradius auch für niedrige Ionenstärke gültig ist, wurde die Streuung von 28 S RNA aus Rattenleber statt authentischer T7-m-RNA (30 S), die nicht zur Verfügung stand, bei beiden Ionenstärken verglichen. Die Streuung der 28 S RNA ist bei niedriger Ionenstärke bei $\psi = 90^\circ$ und $\lambda = 350$ nm um 12% geringer als bei hoher. Der Streumassenradius ist deswegen um weniger als 12% größer. Diese Abschätzung für den Streumassenradius durch eine Streuungsmessung bei einem einzigen Winkel ($\psi = 90^\circ$) ist nur in diesem Fall möglich, weil die Guinier-Bedingung für die Rattenleber-RNA mit 28 S sicherlich ebenso erfüllt ist, wie für die T7-m-RNA mit 30 S. Diese Abweichung des Streumassenradius bei niedriger Ionenstärke um weniger als 12% ist tolerierbar. In Kapitel 2.3.2.1.4. wird diskutiert, wie sich Fehler in der

Bestimmung des Streumassenradius auf den Verlauf der gerechneten Streuintensität in Abhängigkeit von der Zeit auswirken. Eine drastische Änderung der Konformation von RNA ist erst bei sehr geringen Mg^{++} -Konzentrationen zu erwarten. Von Schultze et al.⁴³⁾ wurde das Sedimentationsverhalten von 23 S RNA in Abhängigkeit von der Mg^{++} -Konzentration untersucht. Ihre Messungen ergaben einen Anstieg der Sedimentationskonstante der RNA um 5 S bei einer Erhöhung der Mg^{++} -Konzentration von $5 \cdot 10^{-4} M$ auf $7 \cdot 10^{-3} M$.

Die Streuung ($\lambda = 350 \text{ nm}$, $\varphi = 90^\circ$) der RNA, sowohl der 28 S RNA aus Rattenleber als auch der T7-m-RNA, nimmt bei Entzug des Mg^{++} durch Zugabe einer äquimolaren Menge von EDTA um ca. 80% ab. Offensichtlich wird durch Entzug von Mg^{++} die kompakte Struktur der RNA in eine Knäuel-Struktur ähnlich derjenigen der DNA umgewandelt. Die Abhängigkeit der RNA-Struktur vom Ionenmilieu wurde durch Infrarotspektroskopie von Herbeck et al.⁵⁰⁾ untersucht. Sie fanden, daß Mg^{++} Kompaktheit und Anteil doppelhelikaler Regionen ribosomaler 23 S RNA erhöht.

2.3.2.1.1.2. Der Formfaktor $P(t)$ der naszierenden RNA (Kugelmodell)

Der einfachste streuäquivalente Körper, der mit den Daten vereinbart werden kann, ist eine Kugel mit einem Radius von 60 nm. Die zeitabhängige Variable in der Formfaktorfunktion $P(\chi, t)_{\text{Kugel}}$ der Gleichung (3):

$$P(t)_{\text{Kugel}} = \left(3 \cdot \frac{\sin(\chi \cdot r(t)) - \chi \cdot r(t) \cos(\chi \cdot r(t))}{(\chi \cdot r(t))^3} \right)^2$$

ist der Radius $r(t)$ der wachsenden RNA-Kugel.

$$r(t) = r(M_0(t)) = \sqrt[3]{\frac{3M(t)}{4\pi\rho}} \quad (9)$$

ρ ist die Dichte der wachsenden RNA. Unter der Annahme, daß die Dichte der RNA in statu nascendi und nach Termination gleich bleibt, kann ρ durch das Volumen V_0 und die Masse M_0 der fertigen RNA mit dem Radius r ausgedrückt werden:

$$\rho = \frac{M_0}{V_0} = \frac{M_0}{\frac{4}{3}\pi r^3} \quad (10)$$

Setzt man aus Gleichung (10) in Gleichung (9) ein, erhält man:

$$r(t) = r \cdot \sqrt[3]{\frac{M(t)}{M_0}} \quad (11)$$

Mit den Gleichungen (6-8) und (11) eingesetzt in Gleichung (9) folgt die zeitabhängige Streufunktion der naszierenden RNA innerhalb einer Transkription bei totaler Synchronie:

$$I(t)_n \propto \left(3 \cdot m \cdot v \cdot \frac{\sin(q \cdot \sqrt[3]{t}) - q \cdot \sqrt[3]{t} \cos(q \cdot \sqrt[3]{t})}{q^3} \right)^2 \quad (12)$$

mit

$$q = 2\pi r \sqrt[3]{\frac{m \cdot v}{M_0}}$$

2.3.2.1.1.3. Der Formfaktor $P(t)$ der RNA (Gauß-Knäuel-Modell)

Das zweite Modell, das mit den Daten zu vereinbaren ist (Fig.9), ist ein Gauß-Knäuel mit einer Persistenzlänge von 4 nm. Aus Gleichung (4b) ergibt sich der zeitabhängige Formfaktor:

$$P(t)_{\text{Gauß-Knäuel}} = \frac{2}{S(t)^2} (e^{-S(t)} + S(t) - 1) \quad (13)$$

mit

$$S(t) = \frac{2}{3} \sum_{i=1}^L a^2 \cdot N(t)$$

wobei

$$N(t) = \sum_{i=1}^{L/2a} \Theta \left(\frac{2a}{d \cdot v} \cdot i - t \right)$$

eine Stufenfunktion ($\Theta(x - t) = 0$ für $t < x$; $\Theta(x - t) = 1$ für $t > x$) ist. d ist der Abstand zwischen den Nukleotiden in der RNA. Aus Gleichung (5) und (7) erhält man:

$$I(t) \propto \left(m \cdot \frac{2a}{d} \cdot N(t) \right)^2 P(t)_{\text{Gauß-Knäuel}} \quad (14)$$

Mit Gleichung (13) erhält man somit die zeitabhängige Streufunktion der RNA als Gauß-Knäuel:

$$I(t)_{\text{G-Knäuel}} \propto \left(\frac{3m}{d \sum_{i=1}^L a} \right)^2 2 \cdot (e^{-S(t)} + S(t) - 1) \quad (15)$$

Fig. 10 zeigt normalisierte zeitabhängige Streukurven mit $m = 300$ pro Nukleotidrest, $v = 65$ Nukleotiden/sek. (s. unten), $M_0 = 2.2 \cdot 10^6$ ^{42,43}, $r = 60$ nm (s. oben), $d = 0.34$ nm. Kurve 1 ist nach Gleichung (5) mit den Gleichungen (6) und (7) mit $P(x, t) = 1$ (Punktstreuer) berechnet. In diesem Fall ist $I(t)$ proportional zum Quadrat der Zeit. Berücksichtigt man den Formfaktor der naszierenden RNA wird der zeitliche Verlauf der Streuintensität nach Gleichung (12) bzw. (15) flacher, wie man aus den Kurven 2 und 3 der Fig. 10 sieht. Die Streukurven für eine RNA, die als Kugel (Kurve 2) bzw. als Gauß-Knäuel (Kurve 3) angenommen wird, sind sehr ähnlich.

2.3.2.1.2. Der Beitrag zur zeitabhängigen Streuung auf Grund von Interferenzen zwischen der wachsenden RNA und der DNA im Elongationskomplex

Die Streuintensität des RNA-DNA-Komplexes ist nicht gleich der Summe der Intensitäten der einzelnen Moleküle, Es gibt einen zeitabhängigen Term zusätzlich zu dem durch die wachsende RNA allein verursachten Hauptstreubeitrag (s.oben). Im gebundenen Zustand ist die Zahl der streuenden Elemente, die auf Grund der Phasenbeziehung der streuenden Wellen miteinander interferieren können größer. Das bedeutet, daß es zusätzliche Interferenzen zwischen den beiden aneinander gebundenen Molekülen gibt.

Um den Interferenzterm von i gebundenen Molekülen mit den Streuamplituden $A_i(\vec{r})$ allgemein abzuleiten, geht man von der Streuintensität des Komplexes aus. Den Interferenzterm erhält man durch räumliche Mittelung des Quadrats der Vektorsumme der Amplituden $A_i(\vec{r})$ der einzelnen Moleküle.

Die Streuintensität des Komplexes aus DNA und der naszierenden RNA wird durch die sich zeitlich ändernden

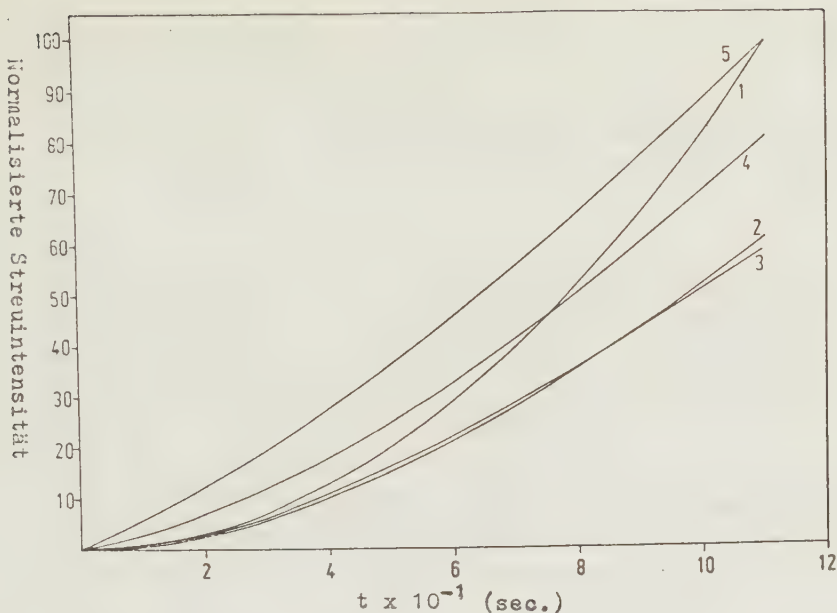


Fig. 10

Die Zeitabhängigkeit der Streuung der naszierenden RNA:
Die Kurven 1 bis 3 zeigen die Streuung der RNA ohne Berücksichtigung von Interferenzen mit der DNA bzw. der RNA-Polymerase.

In Kurve 1 ist die RNA als Punktstreuer angenommen,
in Kurve 2 als Kugel,
in Kurve 3 als Gauß-Knäuel mit einer Persistenzlänge von
4 nm.

Kurve 4 zeigt die Streuung der RNA, die wie in Kurve 2
als Kugel angenommen wurde, mit Berücksichtigung der Interferenz von RNA und DNA.

In Kurve 5 wurde noch zusätzlich die Interferenz von RNA
und RNA-Polymerase berücksichtigt.

Alle Kurven sind normiert durch die Intensität I_f eines fertigen RNA-Moleküls angenommen als Punktstreuer und normiert zu $I_f = 100$.

Streuamplituden der RNA $A(\vec{r}, t)_{\text{RNA}}$ und der Amplitude der DNA $A(\vec{r})_{\text{DNA}}$ in folgender Weise ausgedrückt:
($\langle \rangle$ meint räumlich gemittelte Werte).

$$I(t) = \langle (A(\vec{r}, t)_{\text{RNA}} + A(\vec{r})_{\text{DNA}})^2 \rangle, \quad (16)$$

$$= \langle A(\vec{r}, t)_{\text{RNA}}^2 \rangle + 2 \langle A(\vec{r}, t)_{\text{RNA}} \cdot A(\vec{r})_{\text{DNA}} \rangle + \langle A(\vec{r})_{\text{DNA}}^2 \rangle.$$

Es gibt zwei zeitabhängige Terme: Der Ausdruck $\langle A(t)_{\text{RNA}}^2 \rangle = I(t)_{\text{RNA}}$ beschreibt die Streuung der naszierenden RNA allein. $2 \langle A(\vec{r}, t)_{\text{RNA}} \cdot A(\vec{r})_{\text{DNA}} \rangle$ ist der Interferenzterm von RNA und DNA. Die im Elongationskomplex gebundene RNA und T7-DNA können, wie Lichtstreuungsmessungen ergeben haben, näherungsweise als sphärisch symmetrische Körper betrachtet werden: die RNA als Kugel (s.oben), die T7-DNA als Gauß-Knäuel⁵¹⁾. Deswegen kann die räumliche Mittelung zur Berechnung des Interferenzterms auf einfache Weise durchgeführt werden, denn es gibt nur einen einzigen geometrischen Anordnungsparameter, den Abstand der Schwerpunkte von DNA und RNA: $\vec{r}_{\text{R-D}} = \vec{r}_{\text{RNA}} - \vec{r}_{\text{DNA}}$. Wegen der sphärischen Symmetrie kann der Vektor $\vec{r}_{\text{R-D}}$ ersetzt werden durch sein Skalar $|\vec{r}_{\text{R-D}}|$. Die Amplituden können somit einzelnen gemittelt werden: Der Interferenzterm ist mit Gleichung (2):

$$\begin{aligned} 2 \langle A(t)_{\text{RNA}} \cdot A(t)_{\text{DNA}} \rangle &= \\ &= 2 \langle A(t)_{\text{RNA}} \rangle \cdot \langle A_{\text{DNA}} \rangle \cdot \frac{\sin(\chi r(t)_{\text{R-D}})}{\chi r(t)_{\text{R-D}}} \end{aligned} \quad (17)$$

Die gemittelte Streuamplitude erhält man aus Gleichung (12) bzw. (15).

$$\langle A(t)_{\text{RNA}} \rangle = \sqrt{I(t)_{\text{RNA}}} \quad (18)$$

Für die DNA gibt es keine allgemein gültige Streufunktion⁵²⁾. Das Modell, das eine lange DNA am besten beschreibt, ist die sogenannte "worm-like chain"⁵²⁾, die für lange Ketten in das Gauß-Knäuel übergeht. Die Streuamplitude eines solchen Gauß-Knäuels ist (s. Gleichung (4a)):

$$A(N)_{\text{G-Knäuel}} = \frac{\sqrt{2 \bar{a} \bar{m}}}{r_0} \sum_{i=1}^{\bar{L}/2\bar{a}} e^{-\frac{2}{3} \chi^2 \cdot \bar{a}^2 \cdot i} \quad (19)$$

$\bar{a}$ ist die Persistenzlänge der DNA

$\bar{m}$ ist das Molekulargewicht eines Nukleotidrestes (Paar)

r_0 ist der Abstand der Nukleotidreste in der Doppelhelix

$\bar{L}$ ist die Gesamtlänge der T7-DNA

Da der Schwerpunktsabstand von RNA und DNA unbekannt ist, kann der Term $(\sin(\chi r(t)_{\text{R-D}})) / (\chi r(t)_{\text{R-D}})$ nur abgeschätzt werden. Die obere Grenze kann berechnet werden, wenn man annimmt, daß die Schwerpunkte von RNA und DNA übereinander liegen ($r(t)_{\text{R-D}} = 0$). Dann gilt:

$$\frac{\sin(\chi r(t)_{\text{R-D}})}{\chi r(t)_{\text{R-D}}} = 1 \quad (20)$$

Diese Abschätzung ist sehr wahrscheinlich zu hoch.
 Eine bessere Näherung für r ist sein Erwartungswert:⁵³⁾

$$r_{R-D} = \int_0^{r_K} r \cdot w(r) \cdot dr \quad (21)$$

Ist die Aufenthaltswahrscheinlichkeit $w(r) dr$ für den Schwerpunkt der RNA

$$\int_0^{r_K} w(r) dr = 1 \quad (22)$$

innerhalb einer Kugel mit dem Radius $r(t)_K = r(t)_{RNA} + r_{DNA}$, dann erhält man für die Wahrscheinlichkeit den Schwerpunkt der RNA innerhalb einer Schale mit der Dicke dr zu finden:

$$w(r) dr = k \cdot 4\pi r^2 dr \quad (23)$$

Aus der integrierten Gleichung (21) erhält man den Proportionalitätsfaktor k :

$$k = \frac{3}{4\pi r_K} \quad (24)$$

Den Erwartungswert für den Schwerpunktabstand von DNA und RNA erhält man durch Einsetzen von Gleichung (23) und (24) in Gleichung (21) :

$$r_{R-D} = \frac{3}{4} r_K$$

Setzt man diesen Ausdruck in Gleichung (20) ein mit $r_{\text{DNA}} = 500 \text{ nm}$ ⁴⁵⁾, $r_{\text{RNA}} = 60 \text{ nm}$ und $\alpha = 2.538 \cdot 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$ erhält man:

$$\frac{\sin(\alpha r(t)_{\text{R-D}})}{\alpha r(t)_{\text{R-D}}} = -0.08 \quad (25)$$

Das negative Vorzeichen bedeutet, daß es zwischen RNA und DNA destruktive Interferenzen gibt, wenn für ihren Schwerpunktsabstand der wahrscheinlichste eingesetzt wird. Mit den Gleichungen (19), (20) und (25) kann der Bereich des Interferenzterms $I_{\text{RNA-DNA}}$ gemäß Gleichung (17) abgeschätzt werden, normiert durch die Intensität der RNA als Punktstreuer.

$$-0.016 \leq I(t)_{\text{RNA-DNA}} \leq 0.2 \quad (26)$$

Die Zeitabhängigkeit der Streuung der RNA unter Berücksichtigung der maximalen Interferenz von RNA und DNA (d.h. $\sin(\alpha r(t)_{\text{R-D}}) / \alpha r(t)_{\text{R-D}} = 1$) wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$I(t) \propto I(t)_{\text{RNA}} + 2 \cdot I(t)_{\text{RNA}} \cdot \frac{2\bar{a}}{r_0} \bar{m} \sum_{i=1}^{\bar{L}/2\bar{a}} e^{-\frac{2}{3}\alpha^2 \cdot \bar{a}^2 \cdot i} \quad (27)$$

Kurve 4 in Fig. 10 zeigt $I(t)$ gemäß Gleichung (27) mit $m = 600$, dem durchschnittlichen Molekulargewicht eines Nukleotidpaares;

$a = 50 \text{ nm}$, der Persistenzlänge der T7-DNA⁴⁵⁾
 $r_0 = 0.34 \text{ nm}$, dem Abstand zwischen zwei Nukleotiden
 in der Helix,
 $L = 1.3 \cdot 10^4 \text{ nm}$, der Länge der T7-DNA^{51,45)}

2.3.2.1.3. Der Beitrag zur zeitabhängigen Streuung auf Grund
 von Interferenzen zwischen RNA und RNA-Polymerase
 im Elongationskomplex

Den Ausdruck, der die zeitabhängige Streuung auf Grund von
 Interferenzen zwischen RNA und RNA-Polymerase beschreibt,
 erhält man aus Gleichung (17) durch Ersetzen der Amplitude
 (A_{DNA}) der DNA durch die der RNA-Polymerase $(A_{\text{RNA-P}})$.
 Da die RNA-Polymerase einen Streumassenradius von unge-
 fähr 6 nm ^{27,54)} und einen mittleren Durchmesser d von
 15.5 nm (s.oben) hat, sind die Bedingungen für einen Punkt-
 streuer erfüllt: Es gilt: $d/\lambda \leq 1/15$. Daher ist der Form-
 faktor der RNA-Polymerase $P(\alpha)_{\text{RNA-P}} \approx 1$.
 Sitzt die RNA-Polymerase auf der Oberfläche der wachsenden
 "RNA-Kugel", ist der Abstand der Schwerpunkte $r(t)_{\text{PR}}$ von
 RNA und RNA-Polymerase:

$$r(t)_{\text{PR}} = r(t)_{\text{RNA}} + r_{\text{P}}$$

wobei $r_{\text{P}} = 7.6 \text{ nm}$ der mittlere Radius der RNA-Polymerase
 ist.

RNA und Protein haben unterschiedliche Brechungsindexin-
 kremente, mit dem ihre Streuamplituden gewichtet werden
 müssen. Der Interferenzterm ist:

$$I(t)_{\text{RNA-RNAP}} \approx 2 \cdot I(t)_{\text{RNA}} \cdot M_P \cdot \frac{\sin(\alpha r(t)_{\text{PR}})}{\alpha r(t)_{\text{PR}}} \quad (28)$$

$$\left(\frac{\partial c}{\partial n_P} \right) \cdot \left(\frac{\partial n_{\text{RNA}}}{\partial c} \right)$$

$M_P = 397000$ ist das Molekulargewicht des Coreenzyms⁵⁵⁾,
 $\partial n_P / \partial c$ das Brechungsindexinkrement der RNA-Polymerase,
 $\partial n_{\text{RNA}} / \partial c$ das Brechungsindexinkrement der RNA und
 $r(t)_{\text{PR}}$ der Schwerpunktsabstand von RNA und RNA-Polymerase.

Die in der Literatur angegebenen Werte des Brechungsindexinkrementes von RNA und Protein sind 0.194 ml/g ⁵⁶⁾ bzw. $0.182 - 0.189 \text{ ml/g}$ ⁵⁷⁾ bei 546 nm in 0.1 M NaCl . Auf Grund des geringen Unterschiedes kann $\partial c / \partial n_P \cdot \partial n_{\text{RNA}} / \partial c \approx 1$ gesetzt werden. Eine Abschätzung mit den oben angegebenen Brechungsindizes zeigt, daß sich die Streufunktion um weniger als 2% von der genäherten unterscheidet. In Fig. 10 Kurve 5 ist die Zeitabhängigkeit der Streuung der naszierenden RNA unter Berücksichtigung der Interferenzterme von RNA und DNA, und RNA-Polymerase gezeigt.

Die Wechselwirkung der RNA-Polymerase mit der DNA wurde vernachlässigt. Messungen zeigten, daß die Differenz der Streuintensität dieser beiden Moleküle im gebundenen und freien Zustand weniger als 4% der Streuintensität der RNA ausmacht.

2.3.2.1.4. Einfluß des Streumassenradius R der fertigen T7-m-RNA auf den Verlauf der zeitabhängigen Streukurve der naszierenden RNA

Der Verlauf der Streuintensität der wachsenden RNA in Abhängigkeit von der Zeit ist im wesentlichen durch die Größe $M(t)_{\text{RNA}}^2 = (mvt)^2$ bestimmt. Der quadratische Verlauf der Kurven wird durch Berücksichtigung des Formfaktors $P(t)_{\text{RNA}}$ und der Interferenzen zwischen RNA und DNA bzw. zwischen RNA und RNA-Polymerase flacher.

Der Formfaktor wurde aus einer Streukurve bestimmt, die sich aus einer Differenzmessung der Streuung zweier verschieden lang inkubierter Transkriptionsmischungen ergab. Solch eine Bestimmung der Streukurve in einer molekular nicht einheitlichen Lösung wie der Transkriptionsmischung ist ungenau. Deswegen wurde untersucht, welchen Einfluß ein Fehler in der Bestimmung des Streumassenradius bzw. des Radius einer streuäquivalenten Kugel auf den Verlauf der zeitabhängigen Streuung der wachsenden RNA im Elongationskomplex hat. Fig. 11 zeigt gerechnete Kurven für die Streuintensität der wachsenden RNA in Abhängigkeit von der Zeit unter Berücksichtigung der Interferenz mit DNA und mit RNA-Polymerase. Die mittlere Kurve ist dieselbe wie Nr. 5 in Fig. 10. Die einzelnen Kurven in Fig. 11 repräsentieren Streukurven für RNA-Moleküle verschiedener Dichten, bzw. verschiedener finaler Radien von 40 nm (unterste Kurve) bis 100 nm. Um den Unterschied im Verlauf der Kurven besser beurteilen zu können, wurden die Kurven auf denselben Endwert normiert. Bezugspunkt war die Streuung der T7-m-RNA mit dem Radius $r = 60$ nm. Je kleiner r ist, desto mehr nähert sich die Kurve, wie für einen Punktstreuer zu erwarten, einem quadratischen Verlauf. Je größer r wird, desto flacher werden die Kurven. Ein Vergleich von Fig. 11 mit Fig. 13



Fig. 11

Die Zeitabhängigkeit der Streuung von wachsenden RNA-Molekülen mit verschiedenen Dichten unter Berücksichtigung der Interferenz mit DNA und mit RNA-Polymerase. Die Kurven sind so berechnet, daß der Radius der streuäquivalenten RNA-Kugel nach Beendigung der Synthese für die unterste Kurve 40 nm ist, für die darüberliegende jeweils um 10 nm höher. Die Kurven sind auf den gleichen Endwert normiert. Bezugspunkt ist die Streuung der fertigen T7-m-RNA mit einem Radius von $r = 60$ nm.

zeigt, daß sich Änderungen des Radius von 15% auf die Streuung der wachsenden RNA in Abhängigkeit von der Zeit so wenig auswirken, daß solche Abweichungen innerhalb der Meßfehler liegen.

2.3.2.2. Der zeitliche Verlauf der Streuung über mehr als eine Transkriptionsperiode

Für eine total synchrone Synthese würde man einen zeitlichen Verlauf wie er in Fig.12 gezeigt wird, erwarten. Die Streuintensität steigt entsprechend Gleichung (27) und (28) bis zur Termination zum Zeitpunkt $t = \tau$, wo sie wieder um

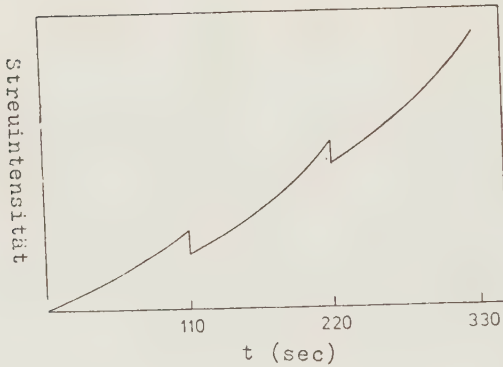


Fig. 12

eine schematische zeitabhängige Streukurve für total synchrone Synthese über 3 Transkriptionszyklen mit einer Zykluszeit von 110 sec.

ungefähr 20% bis 40% abnimmt, weil der Interferenzterm verschwindet, sobald die RNA von DNA und RNA-Polymerase getrennt ist (Vergl. Fig. 10, Kurve 2 und 4).

In der Praxis jedoch ist dieser Idealfall totaler Synchronie über mehrere Transkriptionszyklen kaum zu verwirklichen. Der Grad der Asynchronie der Transkription hängt ab von den speziellen Bedingungen unter denen der Transkriptionsprozeß gestartet wurde, z.B. der Präinkubationszeit von RNA-Polymerase mit DNA. Außerdem nimmt der Grad der Asynchronie mit der Zahl der Transkriptionszyklen zu.

Die Unstetigkeiten in Fig. 12 sind umso ausgeprägter, je synchroner der Transkriptionsprozeß abläuft. Sie verschwinden, wenn die Synthese total asynchron ist. In diesem Fall ist die Lichtstreuintensität direkt proportional zur Menge synthetisierter RNA.

2.3.3. Diskussion der Transkriptionskinetiken, die durch Lichtstreuungs-messungen erhalten wurden

Fig. 4 zeigt Transkriptionskinetiken für verschiedene molare Enzym/DNA Verhältnisse bei hoher Ionenstärke, wo Reinitiation möglich ist. Die Kurven sind glatt, ihre Steigung ist proportional zur Konzentration der RNA und damit zur Konzentration der RNA-Polymerase, wie für asynchrone Transkription zu erwarten ist, (s.oben). Die "Lag Phase" am Beginn jeder Kinetik ist typisch für verzögerte Initiation. Die bei längeren Inkubationszeiten beobachtete Abweichung der Lichtstreuendaten zu höheren Werten im Vergleich zu den Radioaktivitätsmessungen ist wahrscheinlich auf die zunehmende Menge an RNA-Molekülen mit einem Molekulargewicht größer als $2.2 \cdot 10^6$ zurückzuführen. (Da die Streuung dem Quadrat des Molekulargewichts der streuenden Partikel proportional ist, ist die Streuintensität dieser größeren RNA-Moleküle ent-

sprechend größer. Diese RNA-Moleküle werden von Polymerase-Molekülen synthetisiert, die über den "20%-Terminator" hinweglesen. Fig.3 zeigt Transkriptionskinetiken für verschiedene molare Enzym/DNA Verhältnisse bei niedriger Ionenstärke, bei der der Transkriptionszyklus in erster Näherung nur einmal durchlaufen wird. Diese Kurven zeigen keine "Lag Phase", was auf höhere Synchronie der Initiation schließen läßt.

Die gemessene Streuintensität der naszierenden RNA in Abhängigkeit von der Zeit wird durch die aus Gleichung (27,28) gerechnete Kurve bis zu einem Knickpunkt bei $t = 110 \text{ sec.}$, dem Ende der ersten Transkriptionsrunde, innerhalb der Meßfehler angepaßt (s. Fig.13). Diese Zeit von 110 sec. entspricht einer durchschnittlichen Transkriptionsrate von 65 Nukleotiden pro sec pro Kette. Von Davies und Hymen⁵⁹⁾ wurde aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen von transkribierenden Polymerase-Molekülen bei einem molaren Enzym/DNA Verhältnis von 100:1 bei einer Triphosphatkonzentration von $4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ eine Transkriptionsrate von 45 Nukleotiden/sec./Kette bestimmt, von Richardson⁵⁸⁾ an T4-DNA bei einer Triphosphatkonzentration von $2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ eine Transkriptionsrate von 11 Nukleotiden/sec./Kette, von Darlix et al.⁸⁴⁾ an T7-DNA bei einer Triphosphatkonzentration von 10^{-5} M eine Transkriptionsrate von 20 Nukleotiden/sec./Kette.

Für das Verhalten des Transkriptionskomplexes bei niedriger Ionenstärke nach Termination gibt es verschiedene Modelle: Von Schäfer et al.⁶⁰⁾ wurde gezeigt, daß bei einem molaren Enzym/DNA Verhältnis von 1, die RNA nach Termination getrennt vom Transkriptionskomplex in Lösung ist. Bei einem molaren Enzym/DNA Verhältnis größer 1, wird die RNA des ersten, korrekt terminierten Enzym-Moleküls vom Transkriptionskomplex abgetrennt. Alle folgenden RNA-Moleküle bleiben im Transkriptionkomplex gebunden.

Von anderen Autoren, z.B. Chamberlin⁴⁶⁾, wird die Meinung vertreten, daß sich am Terminator RNA-Polymerase und RNA von der DNA trennen. Bei niedriger Ionenstärke sei die RNA fest an die RNA-Polymerase gebunden und deswegen nicht in der Lage zu reinitiiieren.

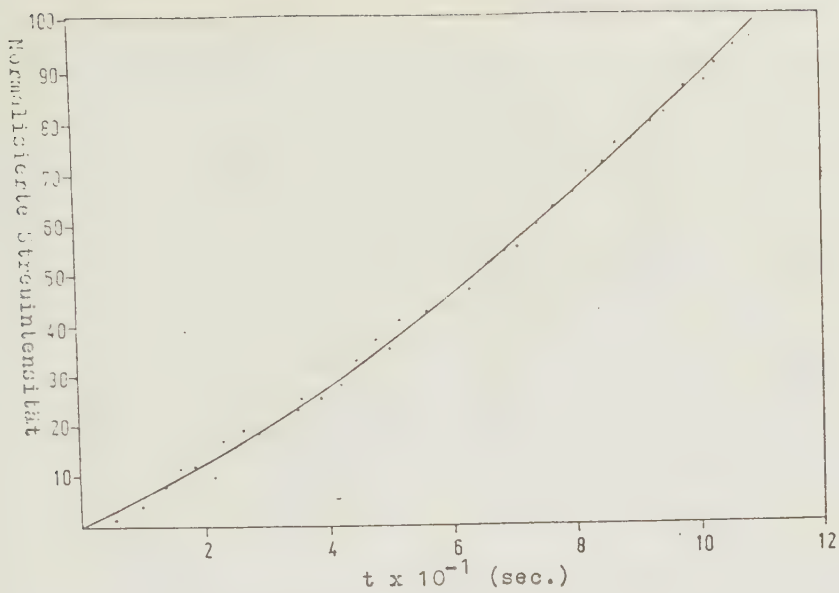


Fig. 13

Vergleich einer gemessenen Streukurve (Nr.3 aus Fig. 3) mit einer gerechneten (Nr. 5 aus Fig.10).

Durch Lichtstreuung hat man prinzipiell die Möglichkeit zwischen diesen Modellen zu unterscheiden, den bei Dissoziation des Transkriptionskomplexes verschwindet der Interferenzterm. Dissoziation von RNA und RNA-Polymerase sollte zu einer Abnahme der Streuung um ca. 25% führen. Die maximal mögliche Abnahme beträgt 30%, wenn der Schwerpunktsabstand von RNA und RNA-Polymerase 0 ist. Welche Intensitätsänderung die Dissoziation von RNA und DNA bewirkt, konnte nur abgeschätzt werden, da der Schwerpunktsabstand zwischen DNA und RNA unbekannt ist. Bei $\lambda = 350 \text{ nm}$ und $\vartheta = 90^\circ$ liegt die Änderung der Streuintensität zwischen 1.5% Anstieg und 18% Abnahme, je nachdem ob für den Schwerpunktsabstand von RNA und DNA der wahrscheinlichste (s. Gleichungen (21 - 26)) oder Koinzidenz der Schwerpunkte (s. Fig. 10, Kurve 4) angenommen wird.

Die bei niedriger Ionenstärke gemessenen Kurven zeigen zwar einen Knick, aber keine Intensitätsabnahme. Das bedeutet, daß der Transkriptionskomplex entweder stabil bleibt, oder sehr langsam zerfällt. Eine klare Aussage ist aus mehreren Gründen nicht möglich:

- a) Die Interferenzterme konnten nur grob abgeschätzt werden. Sie sind einer direkten Messung nur schwer zugänglich.
- b) Eine Intensitätsänderung der Streuung auf Grund von Dissoziation des Transkriptionskomplexes kann durch eine gewisse Asynchronie der Transkription überdeckt werden.
- c) Da die Transkription an T7-DNA bei niedriger Ionenstärke nach der Synthese des $2.2 \cdot 10^6$ -Stückes in 110 sec. (s. Fig. 3) nicht vollständig beendet ist, sondern sich eine zweite langsamere Synthese-Phase anschließt, kann ein langsamer Zerfall des Transkriptionskomplexes nicht erkannt werden.

Die Phase vermindelter RNA-Synthese nach Beendigung der ersten Transkriptionsrunde nach 110 sec. bei niedriger Ionenstärke hat verschiedene Ursachen: Die RNA-Produkte mit einem Molekulargewicht von mehr als $2.2 \cdot 10^6$ (s. Fig. 5a) werden von Polymerase-Molekülen synthetisiert, die nicht korrekt terminieren und über den "20%-Terminator" hinweglesen. Die RNA-Produkte mit einem Molekulargewicht kleiner als $2.2 \cdot 10^6$ werden von zum Teil reinitiiierenden Polymerase-Molekülen synthetisiert, oder von Enzym-Molekülen, die mit Verzögerung aus "langsam startenden Promotoren"⁶⁴⁾ die Synthese beginnen.

2.3.4. Probleme bei nicht homogenen RNA-Proben

Die winkelabhängige Lichtstreuintensität hängt vom Molekulargewicht ab, und bei Nicht-Punktstreuern außerdem von der Form des streuenden Moleküls. Sind die streuenden Moleküle nicht homogen bezüglich ihres Molekulargewichtes und ihrer Form, kann aus den Streumessungen nur ein gemittelter Wert für das Molekulargewicht und den Streumassenradius, der in strengem Zusammenhang mit der Form des streuenden Moleküls steht, bestimmt werden.

Bei genügender Verdünnung kann das durchschnittliche Molekulargewicht von RNA-Molekülen mit i verschiedenen Molekulargewichten M_i in einer Probe durch Extrapolation ihrer Streukurve zum Winkel 0 ermittelt werden. Diese 0-Intensität $I_x(0)$ muß noch durch die 0-Intensität $I(0)$ einer homodispersen RNA-Lösung bekannten Molekulargewichts M normiert werden und mit dem Verhältnis der Konzentrationen (in mg/ml) der bekannten (c) und der unbekannten ($\sum c_i$) RNA multipliziert werden. Die Konzentrationen $\sum c_i$ und c

können durch radioaktiven Einbautest bestimmt werden. Auf diese Weise kann das durchschnittliche Molekulargewicht einer bezüglich der Größe inhomogenen RNA ermittelt werden.

$$\frac{\sum_{i=1}^n c_i \cdot M_i}{\sum_{i=1}^n c_i} = M \cdot \frac{I_x(0)}{I(0)} \cdot \frac{c}{\sum_{i=1}^n c_i} \quad (29)$$

Der gemessene Streumassenradius $\bar{R}$ einer polydispersen RNA-Lösung ist:

$$\bar{R} = \frac{\sum_{i=1}^n c_i \cdot R_i}{\sum_{i=1}^n c_i} \quad (30)$$

Detailliertere Informationen über Molekulargewichtsverteilungen und Form von RNA-Molekülen könnte man durch Streuexperimente mit Strahlung kürzerer Wellenlänge (Röntgenstrahlen statt Licht) erhalten. Jedoch würde dann auch die Interpretation insbesondere der Interferenzterme schwieriger werden, denn viele vereinfachende Näherungen über die Form der Moleküle, wie sie bei der Lichtstreuung anwendbar waren, wären für die Röntgenuntersuchung ungültig.

2.3.5. Aspekte des Mechanismus der Elongation

Die Form der m-RNA kann durch eine Kugel approximiert werden (s.oben). Alle Modelle der Elongation, in denen die RNA als gestrecktes Molekül angesehen wird, können ausgeschlossen werden, weil der gemessene Streumassenradius nur mit einem gefalteten RNA-Molekül vereinbar ist.

Auf Grund dieser Information über die Form der m-RNA können die Trägheits- und Reibungskräfte berechnet werden, die während der Elongation auf die DNA bzw. auf die RNA-Polymerase im Komplex mit der wachsenden RNA (P-R-Komplex) wirken. Mit dem Kenntnis dieser Kräfte soll abgeschätzt werden, ob der P-R-Komplex, der in vivo wegen der Immobilisierung der DNA durch Fixierung an die Membran gezwungen ist, um die DNA zu rotieren, auch in vitro um die unfixierte DNA rotiert. Für die Berechnung müssen einige vereinfachende Annahmen eingeführt werden: Die DNA soll als ein zylinderförmiges Molekül mit dem Radius r_{DNA} und der Länge L_{DNA} angenommen werden, Der P-R-Komplex wird als Kugel mit dem Radius r_{P-R} betrachtet. Der P-R-Komplex bewegt sich spiralförmig an der DNA entlang. Für die Abschätzung der Kräfte, die eine Drehung der DNA bzw. des P-R-Komplexes bewirken, sind nur die tangential zur DNA wirkenden Kräfte zu berücksichtigen. In Fig. 14 ist das der Rechnung zugrunde liegende Modell von RNA, RNA-Polymerase und DNA im Elongationskomplex schematisch dargestellt.

2.3.5.1. Die Trägheitskraft

2.3.5.1.1. Der Beitrag der DNA bei festgehaltenem P-R-Komplex

Rotiert die DNA mit einer Umdrehungsgeschwindigkeit ω um den P-R-Komplex, so ist das Drehmoment D_{DNA} :

$$D_{DNA} = \frac{2}{5} \cdot m_{DNA} \cdot r_s^2 \cdot \frac{d\omega}{dt} \approx m_{DNA} \cdot r_s^2 \cdot \frac{\omega}{t_0} \quad (31)$$

$$r_s = r_{DNA} + r_{P-R} \quad (31a)$$

Die Masse der DNA m_{DNA} im cgs-System ist annähernd:

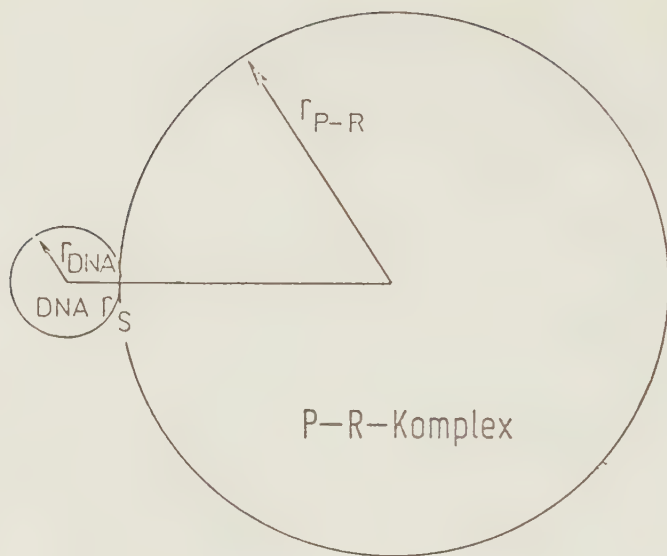


Fig. 14

Schematische Darstellung von DNA und P-R-Komplex zur Berechnung von Drehmoment und Reibungskraft während der Transkription.

$$m_{DNA} = N_{DNA} \frac{m_{12C}}{12} \quad (31b)$$

m_{12C} ist die Masse eines Kohlenstoffatoms.

Wird die DNA mit der Geschwindigkeit von v Nukleotiden/sec. abgelesen, ist die Umdrehungsgeschwindigkeit:

$$\omega = \frac{v}{u}$$

wobei u die Zahl der Nukleotide für eine Drehung auf der Helix ist.

2.3.5.1.2. Der Beitrag des P-R-Komplexes bei festgehaltener DNA

Das Drehmoment des P-R-Komplex D_{P-R} ist analog demjenigen der DNA

$$D_{P-R} = \frac{(M_{RNA} + M_{RNAP})}{12} \cdot m_{12C} \cdot r_s^2 \cdot \frac{\omega}{t_0} \quad (31c)$$

2.3.5.2. Die Reibungskraft

2.3.5.2.1. Der Beitrag der DNA bei festgehaltenem P-R-Komplex

Die Reibungskraft F_{DNA}' , die bei Drehung auf die DNA

wirkt, ist:

$$F_{DNA}' = \frac{dw}{dx} \cdot A \cdot \gamma \quad (32a)$$

wobei $dw/ds = w/r$ der Geschwindigkeitsgradient der Lösung um die bewegte DNA senkrecht zur Bewegungsrichtung.

$A = r_{DNA} \cdot 2\pi L_{DNA}$ die Oberfläche der DNA und
 γ die Viskosität der Lösung ist.
 Somit ergibt sich:

$$F_{DNA} = 2\pi \gamma w_{DNA} L_{DNA} \quad (32b)$$

$$w_{DNA} = \omega r_s \quad (32c)$$

2.3.5.2.2. Der Beitrag des P-R-Komplexes bei fest- gehaltener DNA

Die Reibungskraft F_{P-R} des als Kugel gedachten P-R-Komplexes ist nach dem Stokesschen Gesetz :

$$F_{P-R} = 6\pi \gamma r_{P-R} w_{P-R} \quad (33a)$$

$$w_{P-R} = \omega r_s = w_{DNA}$$

Setzt man für $M_{DNA} = 25 \cdot 10^6$ (45), $m_{12C} \approx 2 \cdot 10^{-23}$ g, $r_{DNA} = 10^{-9}$ cm, $r_{P-R} = 67$ nm (Radius der RNA + Radius der RNA-Polymerase), $v = 65$ Nukleotide/sec., $u = 10$ Nukleotide, $M_{RNA} = 2.2 \cdot 10^6$ (42,43), $L_{DNA} = 1.3 \cdot 10^{-5}$ cm und $\gamma = 0.01$ Poise in die Gleichungen (31) - (33b) ein, erhält man für das Verhältnis der Drehmomente

$$\frac{D_{DNA}}{D_{P-R}} = 9 \quad (34a)$$

für das Verhältnis f der Reibungskräfte:

$$f = \frac{F_{DNA}}{F_{P-R}} = 65 \quad (34b)$$

und für das Verhältnis der Trägheitskraft zur Reibungskraft der DNA bzw. der RNA:

$$\frac{D_{DNA}}{F_{DNA}} = 10^{-10} \quad (34c)$$

$$\frac{D_{DNA}}{F_{P-R}} = 7 \cdot 10^{-10} \quad (34d)$$

mit $\Delta t = 1 \text{ sec.}$

Da die Trägheitskräfte um einige Größenordnungen kleiner als die Reibungskräfte sind, können sie vernachlässigt werden. Allein die Reibungskräfte sind für die Rotation von DNA und P-R-Komplex von Bedeutung.

Das Verhältnis der Reibungskräfte für DNA und P-R-Komplex $f = 65$ zeigt, daß für ein molares Enzym/DNA Verhältnis von 1 die Reibungskraft der DNA um mehr als einen Faktor 65 größer ist, als die des P-R-Komplexes. Diese Abschätzung ist eine untere Grenze, da für den P-R-Komplex die maximale Größe und damit die maximale Reibung eingesetzt wurde, und da die Reibung der DNA, die in Lösung als Knäuel vorliegt, größer ist als die einer zylindrischen DNA, wie für die Abschätzung angenommen.

Bei einem niedrigen molaren Enzym/DNA Verhältnis wird sich also der P-R-Komplex um die DNA drehen.

3. Das Monomer-Dimer-Gleichgewicht der RNA-Polymerase

3.1. Vorbemerkung

Die Aggregation der RNA-Polymerase in Abhängigkeit von der Ionenstärke ist von Stevens⁴⁸⁾, Richardson²³⁾ und Chamberlin²⁴⁾ mit Hilfe von Sedimentationsmessungen untersucht worden. Diese Messungen ergaben, daß mit abnehmender Ionenstärke ($\mu < 0.3$) Coreenzym Aggregate bis zu 6 Protomere bildet und Holoenzym Dimere. Bei Ionenstärken höher als 0.3 sind somit Coreenzym als auch Holoenzym monomer. Bindungskonstanten für die Aggregation wurden aus den Sedimentationsmessungen nicht abgeleitet, da die Interpretation der Daten wegen der Nichtgleichgewichtsbedingungen während der Sedimentation mit sehr großen Schwierigkeiten verbunden ist. Die Kenntnis dieser Bindungskonstanten bei verschiedenen Ionenstärken ist aus folgenden Gründen wünschenswert:

Die Bildungsgeschwindigkeit und die Gleichgewichtskonzentration des Präinitiationskomplexes sollte für RNA-Polymerase in monomerem bzw. dimerem Zustand unterschiedlich sein.

Die Bindung von σ an Coreenzym könnte durch die Aggregation der RNA-Polymerase beeinflusst werden.

Transkriptionsinhibitoren wie Rifampicin und Heparin könnten unterschiedlich mit monomeren oder oligomeren Polymerasemolekülen interagieren und den Grad der Aggregation ändern.

Für Strukturuntersuchungen der RNA-Polymerase durch Röntgen- und Neutronenkleinwinkelstreuung, müssen die Bedingungen bekannt sein, unter denen die RNA-Polymerase in Lösung molekular einheitlich ist.

Das Ziel des vorliegenden Abschnittes der Arbeit ist die

quantitative Beschreibung der Dimerisation von Holoenzym durch die Bestimmung von Bindungskonstanten bei verschiedenen Ionenstärken und die Untersuchung des Einflusses von DNA und Transkriptionsinhibitoren (Rifampicin und Heparin) auf die Dimerisation.

3.2. Lösung der 1. und die Interpretation der Lichtstreuungsdaten notwendigen Gleichungen

3.2.1. Gültigkeit der Punktstreuernäherung für die RNA-Polymerase

Um die Streuung von RNA-Polymerase zu beschreiben, kann die allgemeine Gleichung (1) in folgender Weise vereinfacht werden:

Da für Holoenzym in der monomeren bzw. dimeren Form der Streumassenradius R ungefähr 6 nm bzw. 9 nm ($27,54 \text{ \AA}$) ist, und der mittlere Durchmesser $d = 2\sqrt{5/3} R^{4/3} = 15,5 \text{ nm}$ bzw. $23,2 \text{ nm}$ beträgt, ist die Bedingung für Punktstreuer erfüllt (s. letzter Abschnitt) d.h. in guter Näherung kann der Formfaktor $P(\alpha) = 1$ gesetzt werden. Für Coreenzym und σ' allein gilt die Punktstreuernäherung natürlich entsprechend.

3.2.2. Überlegungen zur Nichtidealität der Lösung

Fig.15 zeigt die Abhängigkeit der Streuintensität von der Konzentration von Holoenzym bei $\mu = 0,4$. Bei dieser Ionenstärke liegt die Polymerase als reines Monomer vor. Die Punkte liegen innerhalb der experimentellen Fehler auf einer Geraden. Deswegen sind Korrekturen auf Grund der Nichtidealität der Lösung nicht notwendig, d.h. die Virialkoeffizienten können 0 gesetzt werden.

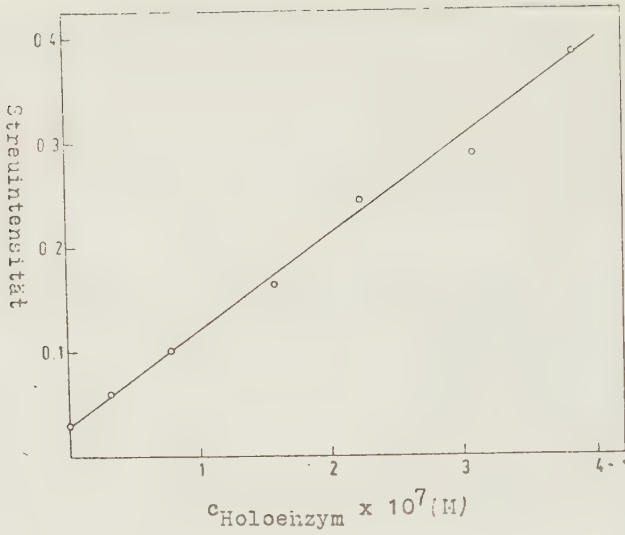


Fig. 14

Lichtstreuintensität in Abhängigkeit von der Konzentration an Holozym gemessen bei der Ionenstärke $\mu = 0.4$

Somit ist in Gleichung (1)

$$\bar{M} = M \quad (36)$$

Mit den Gleichungen (35) und (36) eingesetzt in Gleichung (1), erhält man die vereinfachte Streugleichung:

$$I \propto c \cdot M^2 \quad (37)$$

3.2.3. Herleitung der Gleichungen zur Bestimmung der Bindungskonstanten für die Interaktion von Coreenzym mit dem σ -Faktor ($E+\sigma \rightleftharpoons E\sigma$ Gleichgewicht)

Die Streuintensität I einer Mischung von Coreenzym, und Holoenzym setzt sich aus den Streuintensitäten I_E , I_σ , $I_{E\sigma}$ zusammen:

$$I = I_E + I_\sigma + I_{E\sigma} \quad (38)$$

Mit der vereinfachten Streugleichung (37) kann Gleichung(38) geschrieben werden:

$$I = k (c_E M_E^2 + c_\sigma M_\sigma^2 + c_{E\sigma} M_{E\sigma}^2) \quad (39)$$

k ist ein Proportionalitätsfaktor und kann aus der Streuintensität $\tilde{I}_E$ einer bekannten Coreenzymkonzentration $\tilde{c}_E$ berechnet werden:

$$k = \frac{\tilde{I}_E}{M_E \tilde{c}_E}$$

M_E , $M_{E\sigma}$ und M_σ sind die Molekulargewichte von Coreenzym, Holoenzym und σ . Mit den Erhaltungsgleichungen (c_0 bedeutet totale Konzentration):

$$c_{0E} = c_E + c_{E\sigma} \quad (40)$$

und

$$c_{0\sigma} = c_\sigma + c_{E\sigma} \quad (41)$$

und dem Massenwirkungsgesetz:

$$K = \frac{c_{E\sigma}}{c_E \cdot c_\sigma} \quad (42)$$

kann die Streudifferenz DI zwischen Gesamtstreuung I und der Streuung von Coreenzym und σ in freiem Zustand als Funktion der Bindungskonstanten K ausgedrückt werden.

$$\begin{aligned} DI &= I - k (c_{0E} M_E^2 + c_{0\sigma} M_\sigma^2) = \\ &= k (c_{0E} + c_{0\sigma} + K^{-1} - \sqrt{(c_{0E} + c_{0\sigma} + K^{-1})^2 - 4c_{0E} c_{0\sigma}}) \cdot M_E M_\sigma \end{aligned} \quad (43)$$

DI ist proportional der Holoenzymkonzentration.

3.2.4. Herleitung der Gleichungen für die Bestimmung der Bindungskonstanten K_0 des Monomer-Dimer-Gleichgewichts

Die Streuintensität I einer Mischung von Monomeren (I_M) und Dimeren (I_D) ergibt sich aus Gleichung (37):

$$I = I_M + I_D$$

$$= k (c_M \cdot M_M^2 + c_D \cdot M_D^2) \quad (44)$$

c_M resp. c_D sind die molaren Konzentrationen von Monomeren resp. Dimeren, M_M resp. M_D sind die Molekulargewichte von Monomeren resp. Dimeren, mit

$$M = M_M = \frac{M_D}{2}$$

kann die Streuintensität von Holoenzym im monomeren Zustand ausgedrückt werden:

$$I \approx I_M = k \cdot c_M \cdot M^2 \quad (45)$$

Mit dieser Gleichung kann der Proportionalitätsfaktor k berechnet werden. Mit

$$c_0 = c_M + 2c_D \quad (46)$$

- wobei c_0 die molare Konzentration der Protomere ist, erhält man mit $\Delta I = I - I_M$ die Konzentration an Monomeren:

$$c_M = c_0 \left(1 - \frac{\Delta I}{I_M} \right) \quad (47)$$

und an Dimeren:

$$c_D = \frac{c_o}{2} \cdot \frac{\Delta I}{I_M} \quad (48)$$

Die Bindungskonstante K_b ist:

$$K_b = \frac{c_D}{c_M^2} = \frac{\Delta I \cdot I_M}{2c_o \cdot (I_M - \Delta I)^2} \quad (49)$$

3.3 Ergebnisse

3.3.1. Bestimmung der Absorptionskoeffizienten von Holoenzym, Coreenzym und σ -Faktor

Da für die Bestimmung der Bindungskonstanten genaue Konzentrationsangaben wichtig sind, wurden die molaren Extinktionskoeffizienten von Holoenzym, Coreenzym und σ -Faktor bestimmt (s. Fig. 16) und mit Literaturwerten verglichen (s. Tab. 2).

Tab. 2

Absorptionseigenschaften der RNA-Polymerase

Molarer Extinktionskoeffizient ϵ_{280}^{cm}	Holoenzym	σ	Coreenzym
	$3.1 \cdot 10^5$	$5.7 \cdot 10^4$	$2.5 \cdot 10^5$
Spezifischer Extinktionskoeffizient $E_{1\%}^{1cm}$			
Diese Arbeit	6.3	6.2	6.3
Richardson ⁽⁶⁵⁾	5.9	N.B.	N.B.
Methode von Murphey ⁽⁶⁶⁾	6.4^a	N.B.	6.0
Methode von Scopes ⁽⁶⁶⁾	6.2^a	8.8^a	5.5^a
N.B. = nicht bestimmt			
^a = korrigiert für Lichtstreuung			

3.3.2. Die Lichtstreuung in Abhängigkeit von der Ionenstärke von Coreenzym

Fig. 17 zeigt die Abhängigkeit der Streuintensität des Coreenzyms von der Ionenstärke (μ). Mit zunehmender Ionenstärke ($\mu > 0.4$) nimmt die Streuung linear um ca. 4%/Ionenstärkeinheit ab, da das Brechungsindexinkrement mit steigender Salzkonzentration abnimmt. Bei $\mu < 0.3$ steigt die Streuintensität auf Grund der Aggregation von Coreenzym an. Entsprechend Gleichung (57) sind die Streuintensitäten von

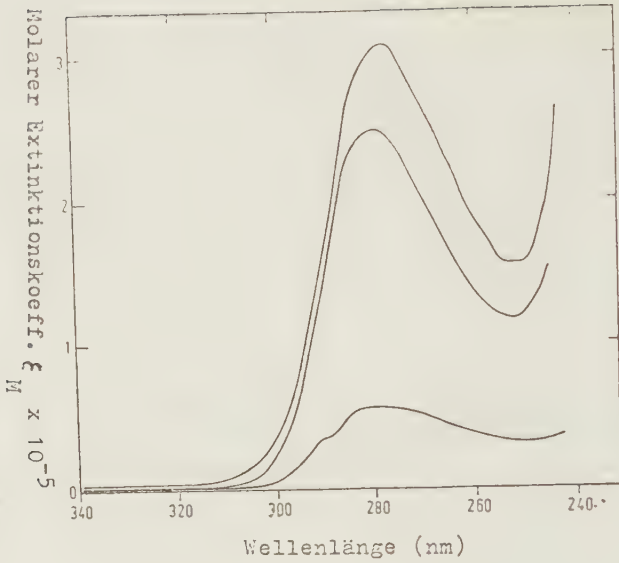


Fig. 16

Absorbtionsspektren von S, Coreenzym und Holoenzym (von unten nach oben) nicht korrigiert für Lichtstreuung.

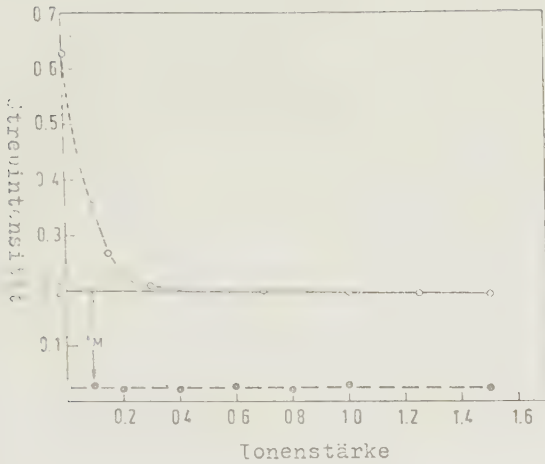


Fig. 17

Ionenstärkeabhängige Lichtstreuung von Coreenzym (o) ($c = 2.4 \cdot 10^{-7} \text{ M}$). (●) ist die Streuung des Puffers. I_M ist die Streuintensität von monomerem Coreenzym. Die Ionenstärke μ wurde durch KCl eingestellt. Die effektive Ionenstärke ist: $\bar{\mu} = \mu_{\text{KCl}} + \mu_{\text{Puffer}}$; $\mu_{\text{Puffer}} = 0.024$.

Coreenzym im monomeren (I_M), im dimeren (I_D) und im oligomeren (I_N) Zustand bei gleicher Gewichtskonzentration an Protomeren:

$$I_M = k \cdot c_M \cdot M_M^2 \quad (50a)$$

$$I_D = k \cdot c_D \cdot M_D^2 = 2I_M \quad (50b)$$

$$I_N = k \cdot c_N \cdot M_N^2 = nI_M \quad (50c)$$

Die Streuintensität bei $\bar{\mu} = 0.024$ ist beinahe viermal so hoch wie bei $\mu = 0.3$. Aus Gleichung (50c) kann man deswegen schließen, daß im Durchschnitt 4er-Aggregate vorliegen. Dies ist jedoch nur eine untere Abschätzung für den Aggregatzustand von Coreenzym, da höhere Aggregate die Punktstreuerbedingung wahrscheinlich verletzen, und deswegen zum Winkel 90° weniger streuen als auf Grund von Gleichung (37) zu erwarten wäre. Da der Konzentrationsanteil der verschiedenen Coreenzymoligomere durch Lichtstreuung nicht bestimmt werden kann, ist eine quantitative Auswertung des Monomer-Oligomer-Gleichgewichts von Coreenzym nicht möglich. Das Monomer-Dimer-Gleichgewicht von Holoenzym dagegen läßt sich durch Bindungskonstanten ausdrücken.

3.3.3. Titration von Coreenzym mit σ^- -Faktor bei verschiedenen Ionenstärken

Um zu entscheiden, ob die Streuung von Holoenzym in Abhängigkeit von der Ionenstärke (s. Fig. 21) allein durch den Monomer-Dimer-Übergang verursacht wird, oder ob auch das $E + \sigma^- \rightleftharpoons E\sigma^-$ -Gleichgewicht die Streudaten beeinflusst, mußten die

Bindungskonstanten für dieses Gleichgewicht bei hoher und niedriger Ionenstärke bestimmt werden. In Fig. 18 ist eine Titrationskurve von Coreenzym mit $\tilde{\sigma}$ -Faktor bei $\mu = 0.024$ gezeigt. Der scharfe Knick am Äquivalenzpunkt zeigt, daß die Bindung zwischen Coreenzym und $\tilde{\sigma}$ -Faktor stark ist. Aus einem Vergleich der gemessenen mit einer gerechneten Titrationskurve wurde die Bindungskonstante abgeschätzt: $K > 5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$.

Bei $\mu = 0.5$ sind Coreenzym wie auch Holoenzym monomer.^{23,24}

Die Titrationskurve in Fig. 19 reflektiert deswegen allein das $E + \sigma \rightleftharpoons E\sigma$ -Gleichgewicht. In Fig. 20 sind die Daten aus Fig. 19 nach Subtraktion der Streuintensitäten von freiem Coreenzym und freiem σ -Faktor aufgezeichnet. Eine nichtlineare Anpassung dieser Daten an Gleichung (43) ergab eine Bindungskonstante von $K (\mu = 0.5) = 1.7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$.

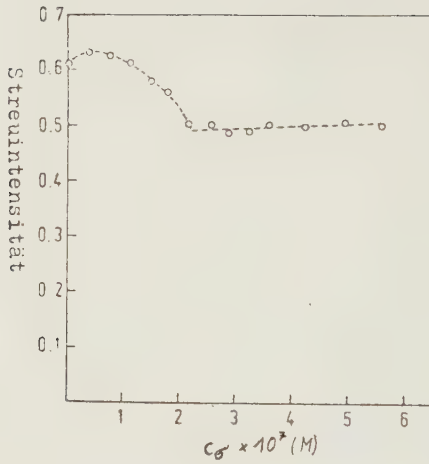


Fig. 18

Titration von Coreenzym ($c = 2.3 \cdot 10^{-7} \text{ M}$) mit σ -Faktor bei $\bar{\mu} = 0.024$ gemessen durch Lichtstreuung. Die Daten sind nicht korrigiert für die Streuung des Puffers ($I_{\text{Puffer}} = 0.03$).

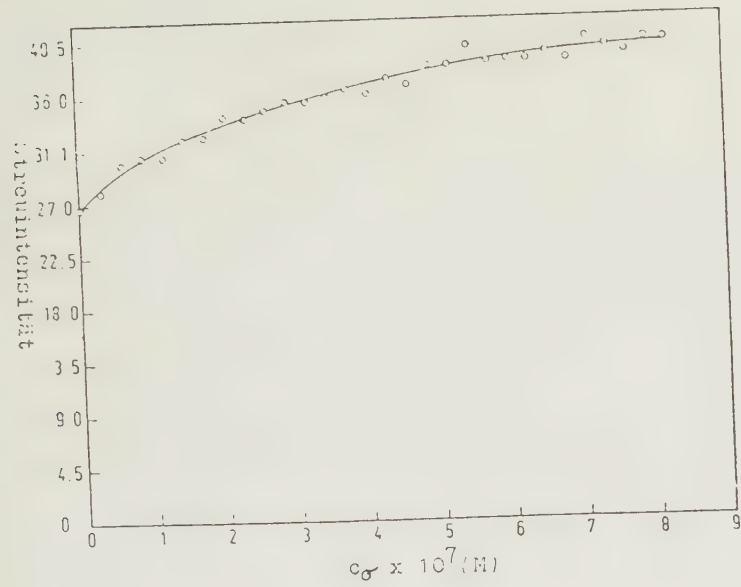


Fig. 19

Titration von Coreenzym ($c = 1.5 \cdot 10^{-7}$ M) mit σ bei $\mu = 0.5$ gemessen durch Lichtstreuung.

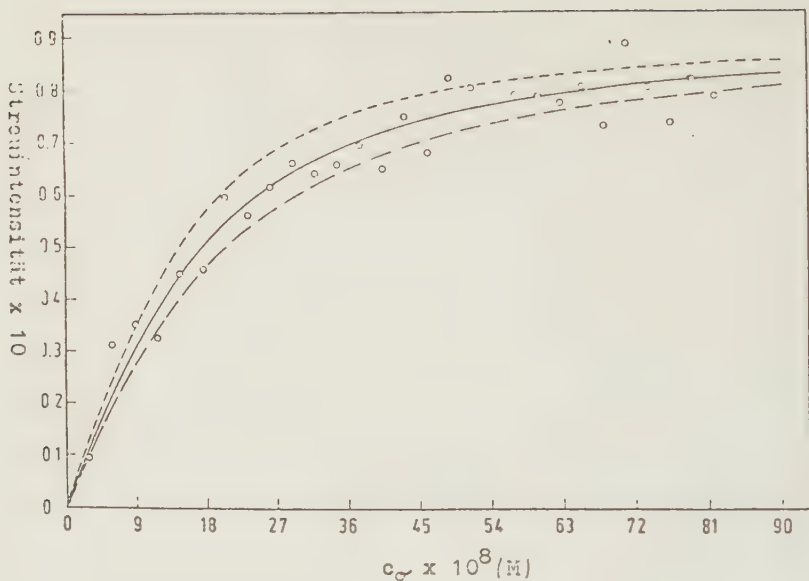


Fig. 20

Titration von Coreenzym mit σ -Faktor bei $\mu = 0.5$. von den Streudaten in Fig. 19 wurden die Streuintensitäten von Coreenzym und σ -Faktor in freiem Zustand subtrahiert. (—) ist die optimal angepaßte Titrationskurve mit $K = 1.7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$, (---) und (-.-) sind gerechnete Titrationskurven mit $K = 2.8 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ und $K = 1.2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$

3.3.4. Die Abhängigkeit des Monomer-Dimer-Gleichgewicht von Holoenzym von der Ionenstärke

3.3.4.1. Lichtstreuungsmessungen

Auf Grund der partiellen Dissoziation von Holoenzym in Coreenzym und σ -Faktor bei hohen Ionenstärken ($\mu=0.5$) kann die Streuintensität von monomerem Holoenzym ($I_{E\sigma}$) nicht direkt gemessen werden. Die gemessene Streuintensität (I_S) muß mit Hilfe der bekannten Bindungskonstante für das Gleichgewicht von $E + \sigma \rightleftharpoons E\sigma$ mit Gleichung (43) korrigiert werden. Für eine Holoenzymkonzentration von $c = 2.3 \cdot 10^{-7}$ M ist das Verhältnis von gemessener zu korrigierter Streuintensität:

$$\frac{I_S}{I_E} = 0.88$$

Die Gerade durch die so berechnete Streuintensität $I_{E\sigma}$ ($\mu=0.5$) mit kleiner negativer Neigung auf Grund der ionenstärkeabhängigen Änderung des Brechungsindexinkrements repräsentiert die Streuung von monomerem Holoenzym (s.Fig.21). Bei $\mu = 0.024$ ist die Streuintensität doppelt so hoch wie die des monomeren Holoenzym. Dies ist entsprechend Gleichung (50b) zu erwarten. Die Streudifferenz ΔI im Bereich $0 < \mu \leq 0.3$ zwischen gemessener Streuung und der Streuung von monomerem Holoenzym (s.Fig.21) ist proportional der Konzentration an dimeren Enzymmolekülen (s.Gleichung (48)). Die daraus errechneten Bindungskonstanten für das Monomer-Dimer-Gleichgewicht bei verschiedenen Ionenstärken sind in Fig. 23 dargestellt.

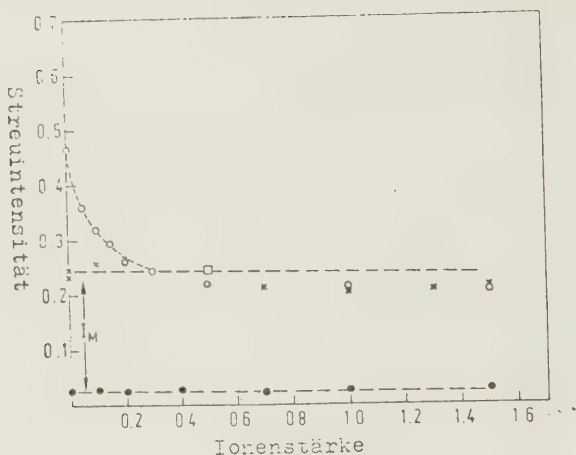


Fig. 21

Die Streuung von Holoenzym ($c = 2.3 \cdot 10^{-7}$ M) (o) in Abhängigkeit von der Ionenstärke μ . (●) ist die Streuung des Puffers. I_M ist die Streuintensität von monomerem Holoenzym. (□) ist die für partielle Dissoziation von Holoenzym in Coreenzym und σ -Faktor korrigierte Streuung. (x) ist die Streuung von Holoenzym in Gegenwart von $3.3 \cdot 10^{-6}$ M Heparin.

3.3.4.2. Neutronenstreuungsmessungen

Der Grad der Dimerisation des Holoenzym (c = $2.3 \cdot 10^{-7}$ M) im Bereich $0.2 < \mu < 0.3$ ist klein (s. Fig. 17). Deswegen wirken sich Fehler in der Messung von ΔI stark auf den Wert der Bindungskonstanten aus. Dieses Problem kann durch Messungen bei höherer Polymerasekonzentration umgangen werden. Jedoch sind für Lichtstreuungsmessungen bei Polymerasekonzentrationen über $5 \cdot 10^{-6}$ M Korrekturen nötig, die die Nichtidealität der Lösung berücksichtigen. Um dies zu vermeiden, wurde statt der Lichtstreuung die Neutronenstreuung gemessen. Da die Neutronen kurzwelliger als Licht sind, sind solche Korrekturen erst bei sehr hohen Holoenzymkonzentrationen (ca. 40 mg/ml) nötig^{27,54}). Für die Berechnung der Bindungskonstanten aus Neutronenstreuungsmessungen kann derselbe Formalismus wie für die Lichtstreuung benutzt werden, obwohl die RNA-Polymerase im Fall der Neutronenstreuung die Punktstreuerbedingung ($d/\lambda < 1/15$) nicht erfüllt, da die de Broglie-Wellenlänge der kalten Neutronen ungefähr hundertmal kleiner ist als die für die Lichtstreuung benutzte Wellenlänge. Für die zum Winkel 0 extrapolierte Neutronenstreuintensität ist jedoch Gleichung (35): $\lim_{\lambda \rightarrow 0} P(\lambda) = 1$ erfüllt. Die mit Hilfe von Gleichung (49) aus den Streuintensitäten I_0 bei den verschiedenen Ionenstärken (s. Fig. 22) berechneten Bindungskonstanten sind in Fig. 23 dargestellt. Korrekturen, die die Dissoziation von Holoenzym in Coreenzym und σ -Faktor berücksichtigen, können bei der benutzten Konzentration von $c = 1.4 \cdot 10^{-5}$ M vernachlässigt werden.

Der aus den Neutronen- und Lichtstreudaten berechnete Logarithmus der Bindungskonstanten läßt sich in Abhängigkeit von der Ionenstärke durch eine Gerade anpassen, die durch die Gleichung

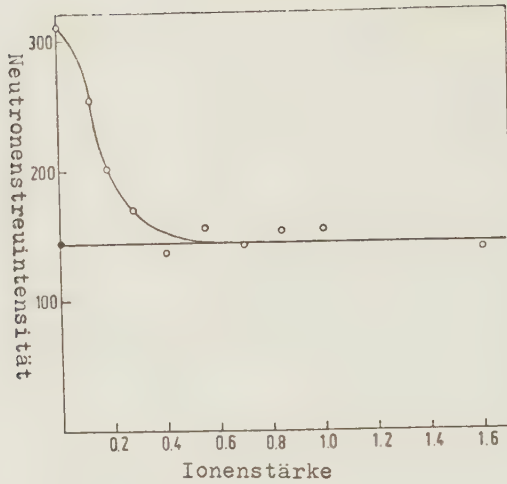


Fig. 22

Die zum Winkel $\gamma = 0$ extra_polierte Neutronenstreuung I_0 von Holoenzym ($c = 1.4 \cdot 10^{-5}$ M) (o). (●) ist die Streuung $I_0(\bar{\mu} = 0.024)$ in Gegenwart von Heparin. ($c = 2 \cdot 10^{-4}$ M).

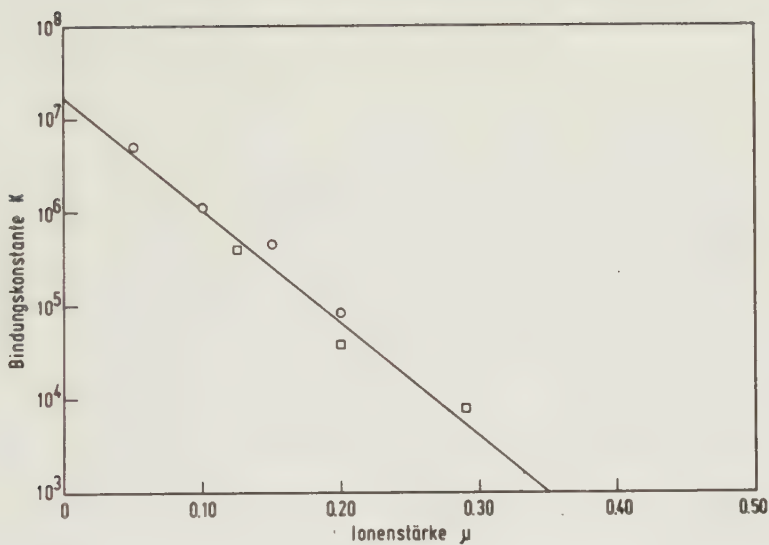


Fig. 23

Die Bindungskonstanten des Monomer-Dimer-Gleichgewichts in Abhängigkeit von der Ionenstärke bestimmt durch Lichtstreuung (•) aus Fig. 21 und durch Neutronenstreuung (o) aus Fig. 22.

$$\log K_0(\mu) = \log 2 \cdot 10^7 - 30.5\mu \quad (51)$$

beschrieben wird.

3.3.5. Abschätzung kinetischer Konstanten des Monomer-Dimer-Gleichgewichts

Die Kinetiken für die Einstellung des Monomer-Dimer-Gleichgewichts bei den verschiedenen Ionenstärken konnte nicht direkt verfolgt werden, weil die Reaktion im Vergleich zur Mischzeit von 5 sec. zu schnell ist. Deswegen konnten nur untere Grenzen für die Hin- und Rückreaktionskonstanten (k_{on} und k_{off}) bestimmt werden.

Um k_{on} bei $\mu = 0.05$ zu bestimmen wurde 0.05 ml monomeres Holoenzym ($\mu = 0.4$, $c = 8 \cdot 10^{-7}$ M) gemischt mit 0.45 ml Tris/HCl-Puffer (ohne Salz). Die Einstellung des Gleichgewichts war, wie das stabile Lichtstreusignal zeigt, innerhalb der Mischzeit beendet. Die untere Grenze für k_{on} ist daher :

$$k_{on}(\mu=0.05) \geq 1.3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$$

Die Dissoziationskonstante k_{off} bei $\mu = 0.4$ wurde in entsprechender Weise versucht zu bestimmen. Da auch in diesem Fall die Reaktion innerhalb der Mischzeit beendet war, ist nur eine Abschätzung möglich:

$$k_{off}(\mu=0.4) \geq 0.2 \text{ sec}^{-1}$$

3.3.6. Einfluß der Inhibitoren Rifampicin und Heparin auf das Monomer-Dimer-Gleichgewicht von Holoenzym

Das Monomer-Dimer-Gleichgewicht von Holoenzym ($c = 2.3 \cdot 10^{-7} \text{ M}$) wird im Ionenstärkebereich $0 < \mu \leq 1.0$ durch Rifampicin ($c = 3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) nicht geändert. Durch Heparin ($c = 3.3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) dagegen wird auch bei niedriger Ionenstärke dimeres Holoenzym vollständig in monomers umgewandelt (s. Fig. 21 und Fig. 22). Der Monomerisierungseffekt⁶⁷⁾ von Heparin nimmt mit steigender Ionenstärke (s. Fig. 21) ab wahrscheinlich auf Grund der Dissoziation des Polymerase-Heparin-Komplexes⁶⁷⁾.

3.3.7. Einfluß von T7-DNA auf das Monomer-Dimer-Gleichgewicht von Holoenzym

Der Aggregationszustand der an DNA gebundenen Polymerase kann aus Streuungsmessungen nicht unmittelbar bestimmt werden, da als zusätzliche Unbekannte der Interferenzterm zwischen Polymerase und DNA die Interpretation erschwert. Um diese Schwierigkeit zu umgehen, wurde die DNA mit DNAase verdaut. Dies erlaubt die Vernachlässigung des Interferenzterms. Die durch die Polymerase geschützten 30 - 40 Basenpaare^{68,69)} der DNA erhöhen die Streuung um weniger als 4%. In Fig. 24 sind die bei einer Ionenstärke von $\mu = 0.067$ (0.05 M KCl, 0.007 M MgCl) gemessenen Streuintensitäten von DNA und RNA-Polymerase allein, als Komplex und als mit DNAase verdauter Komplex aufgezeichnet: Die gemessene Streuintensität ($I_p = 0.042$) des Holoenzym ($c = 4.1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$) stimmt im Rahmen der Fehler mit dem theoretisch erwarteten Wert ($\bar{I}_p = 0.044$) überein. Dieser Wert $\bar{I}_p$ wurde auf folgende Weise bestimmt: Holoenzym liegt bei der Ionenstärke $\mu = 0.067$ als Monomer-Dimer-Gemisch vor. Die Bindungskonstante ist nach Gleichung (51) für $\mu = 0.067$ $K = 1.3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$. Die

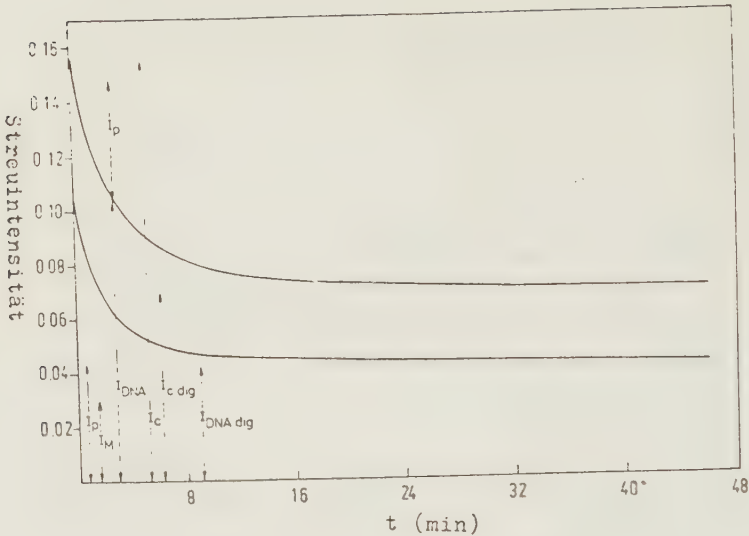


Fig. 24

Monomerisierung von Holoenzym ($c = 4.1 \cdot 10^{-8}$ M) durch T7-DNA ($c = 1.2 \cdot 10^{-8}$ M) bei $T = 25^{\circ}\text{C}$ und $\mu = 0.067$ (0.05 M KCl, 0.007 M MgCl).

I_p ist die Streuung des Holoenzym bei $\mu = 0.067$.

I_M ist die Streuung von monomerem Holoenzym bei $\mu = 0.5$ korrigiert für partielle Dissoziation in Coreenzym und σ -Faktor.

I_M die von monomerem Holoenzym bei $\mu = 0.5$ korrigiert für partielle Dissoziation in Coreenzym und σ -Faktor,

I_{DNA} die der T7-DNA,

$I_{\text{DNA dig}}$ die nach Verdau der DNA,

I_c die des Polymerase-DNA-Komplexes,

$I_c \text{ dig}$ die nach Verdau.

Konzentration an dimerem Holoenzym ist demnach und nach Gleichung (46) und (49) bei einer Gesamtkonzentration von $c_0 = 4.1 \cdot 10^{-8}$ M $c_D = 8.05 \cdot 10^{-9}$ M. Die Streuintensität des Monomer-Dimer-Gemisches ($\tilde{I}_P = 0.044$) kann aus den Gleichungen (47) und (48) errechnet werden, wobei für I_M die bei $\mu = 0.5$ gemessene und nach Gleichung (43) für partielle Dissoziation des Holoenzym korrigierte Streuung des Monomer ($c_M = 4.1 \cdot 10^{-8}$ M) $I_M = 0.03$ eingesetzt wird.

Die Streuintensität des Komplexes (I_C) von RNA-Polymerase und T7-DNA ($c_{DNA} = 1.2 \cdot 10^{-8}$ M) ist auf Grund von Interferenzen im Komplex größer als die Summe der Streuintensitäten von Holoenzym (I_P) und DNA (I_{DNA}) einzeln gemessen. Die Intensitätsdifferenz des Komplexes ($I_{C \text{ dig}}$) und der DNA allein ($I_{DNA \text{ dig}}$) ist nach einer Hydrolyse von 30 Minuten innerhalb der Fehlergrenzen gleich der Streuung von monomerem Holoenzym ($I_M = 0.03$) (s. Fig. 24).

3.4. Diskussion

Das Monomer-Dimer-Gleichgewicht des Holoenzym kann nur im Zusammenhang mit dem $E + \sigma \rightleftharpoons E\sigma$ -Gleichgewicht diskutiert werden, da beide dissoziierbaren Systeme sich gegenseitig überlagern. Man kann also nicht ohne weiteres entscheiden, ob eine Änderung des Lichtstreusignals durch eine Änderung des $E + \sigma \rightleftharpoons E\sigma$ -Gleichgewichts hervorgerufen wird, oder durch eine Änderung des Monomer-Dimer-Gleichgewichts. Durch Fluoreszenzmessungen kann die Bindungskonstante des $E + \sigma \rightleftharpoons E\sigma$ -Gleichgewichts jedoch direkt bestimmt werden. Bei $\mu = 0.3$ ist $K = 3.5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ (86). Mit abnehmender Ionenstärke wird die Bindungskonstante größer. Bei $\mu = 0.1$ ist $K > 10^9 \text{ M}^{-1}$. Diese Information erlaubt eine Abschätzung des Dissoziationsgrades von Holoenzym. Bei $\mu = 0.3$ und $c = 2.3 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ sind ca. 10% des Holoenzym dissoziiert. Die Abnahme der Streuintensität auf Grund dieser partiellen Dissoziation beträgt ca. 3% der gesamten Streuintensität. Da die Bindungskonstante für das $E + \sigma \rightleftharpoons E\sigma$ -Gleichgewicht mit abnehmender Ionenstärke zunimmt, kann die Dissoziation unterhalb von $\mu = 0.3$ vernachlässigt werden.

Die starke Bindung zwischen Coreenzym und σ -Faktor bei niedriger Ionenstärke wird auch durch die mit Hilfe der Lichtstreuung durchgeführten Titration (Fig. 18) bestätigt. Oligomeres Coreenzym wird durch die Zugabe von äquimolaren Mengen an σ -Faktor vollständig in dimeres Holoenzym überführt. Der scharfe Knick am Äquimolaritätspunkt zeigt, daß Coreenzym an σ stark gebunden ist ($K > 5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$). Der konkave Verlauf der Titrationskurve im Bereich substoechiometrischer Mengen von σ kann durch die Annahme erklärt werden, daß in einem Gemisch verschiedener Coreenzymaggregate ein Teil der σ -Bindungsplätze durch die Coreenzymprotomere selbst besetzt sind. Durch Zugabe von σ werden zunächst die freien

σ -Bindungsplätze besetzt. Erst eine weitere Zugabe von σ führt zum Übergang von oligomerem Coreenzym über verschiedene Zwischenstufen zu dimerem Holoenzym. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen Lill et al.⁸⁶⁾, die Coreenzym mit σ im molaren Verhältnis von 1 : 0.15 bis 1 : 1.25 mischten und gelelektrophoretisch das Auftreten von Holoenzym analysierten.

Diese Titrationsmethode mit Hilfe der Lichtstreuung ist geeignet, die Menge an σ zu bestimmen, die notwendig ist, um Coreenzym abzusättigen, z.B. wenn die Rekonstitution von Holoenzym beabsichtigt ist. Die Ergebnisse stimmen mit denen einer Titrationsprozedur überein, bei der die Änderung der Tryptophanfluoreszenz von Coreenzym und σ -Faktor das Signal zur Bestimmung der Menge gebildeten Holoenzym ist (s. Methoden). Aus dem Sättigungspunkt solcher Titrationen konnte eine unbekannte Konzentration an σ -Faktor aus der bekannten Konzentration an Coreenzym bestimmt werden, da das stoechiometrische Verhältnis von Coreenzym und σ -Faktor 1 : 1 ist. Auf diese Weise wurde die für die Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten von σ notwendige Konzentrationsbestimmung erhalten. Der in dieser Arbeit bestimmte Extinktionskoeffizient von σ unterscheidet sich von den von Jendrisac et al.⁶⁶⁾ bestimmten Werten (vergl. Tab. 2). Die Diskrepanz kann nicht diskutiert werden, da bei diesen Autoren nähere Angaben zur Methode fehlen.

Da Holoenzym unterhalb von $\mu = 0.3$ kaum dissoziiert ist, ist der Anstieg der Lichtstreuung in diesem Ionenstärkebereich fast ausschließlich auf die Dimerisation des Holoenzym zurückzuführen, d.h. die Dimerisation kann hier unabhängig vom $E + \sigma \rightleftharpoons E\sigma$ -Gleichgewicht behandelt werden. Im Bereich $\mu > 0.3$ liegt Holoenzym als Monomer vor. Die Abnahme der Lichtstreuung wird deswegen allein durch partielle Dissoziation des Holoenzym verursacht. Dies wird

durch die Titration von Coreenzym mit σ -Faktor bei $\mu = 0.5$ bestätigt. Der Anstieg der Streuung entspricht dem auf Grund von Gleichung (37) erwarteten Wert für die Bildung von Holoenzym.

Für die Bestimmung der Bindungskonstanten des Monomer-Dimer-Gleichgewichts ist es notwendig die Streuung von Holoenzym im monomeren Zustand zu kennen. Bei hoher Ionenstärke ($\mu = 0.5$) ist das Enzym zwar monomer, die Streuung muß aber für partielle Dissoziation in Coreenzym und σ -Faktor korrigiert werden. Bei $\mu = 0.5$ ($K = 1.7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$) und $c = 2.3 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ sind ca. 40% des Holoenzym dissoziiert. Die korrigierte Streuintensität (I_M) von monomerem Holoenzym kann in Gleichung (49) eingesetzt werden, um die Bindungskonstanten für das Monomer-Dimer-Gleichgewicht zu bestimmen. Die aus der Lichtstreuung und aus der Neutronenkleinwinkelstreuung, bei der eine ca. 80 mal höhere Holoenzymkonzentration benutzt wurde, erhaltenen Bindungskonstanten bei den verschiedenen Ionenstärken lassen sich durch eine empirische Gleichung beschreiben:

$$K = 2 \cdot 10^7 \cdot e^{-30.5\mu} \quad (52)$$

Monomerisierung von Holoenzym wird durch den Transkriptionsinhibitor Heparin⁶⁷⁾ (s. Fig. 21 und Fig. 22), durch Polydesoxyoligonukleotide⁷⁰⁾ und durch T7-DNA (s. oben) verursacht. Die Dimerisation der RNA-Polymerase ist bei der Interpretation der RNA-Polymerase-Promotor-Wechselwirkung zu berücksichtigen: Wie groß der Einfluß des Monomer-Dimer-Gleichgewichts auf die Polymerase-Promotor-Interaktion ist, hängt von den speziellen Versuchsbedingungen ab, d.h. von der Größe der Reaktionsgeschwindigkeiten und der Bindungskonstanten des Monomer-Dimer-Gleichgewichts und der Größe der Konstanten, die die Polymerase-Promotor-Wechselwirkung beschreiben;

Die Gleichgewichtskonzentration an Promotor-Polymerase-Komplex wird dann erniedrigt, wenn die Bindungskonstante für das Monomer-Dimer-Gleichgewicht in derselben Größenordnung liegt wie das Polymerase-Promotor-Gleichgewicht. In diesem Fall konkurrieren beide Gleichgewichte miteinander.

Die bis jetzt publizierten Geschwindigkeitskonstanten der Bindung von RNA-Polymerase an die DNA wurden ohne Berücksichtigung des Monomer-Dimer-Gleichgewichts bestimmt. Sie sind zu niedrig, da die Zahl der Polymerasemoleküle, die mit der DNA interagieren können, auf Grund der Dimerisation des Holoenzym erniedrigt wird. In welchem Maß die Geschwindigkeitskonstanten der Monomerisation die apparenten Geschwindigkeitskonstanten für die Bindung an die DNA beeinflussen, bleibt ungeklärt, denn die Geschwindigkeitskonstanten für das Monomer-Dimer-Gleichgewicht konnten nur abgeschätzt werden. Außerdem ist unbekannt, ob es einen Übergangszustand gibt, in dem das Holoenzym als Dimer an die DNA gebunden ist.

4. Die Bindung von Rifampicin an RNA-Polymerase

4.1. Vorbemerkung

Der Mechanismus der Bindung von Rifampicin an RNA-Polymerase wurde von verschiedenen Autoren untersucht: Wehrli⁷²⁾ bestimmte mittels radioaktiv markiertem Rifampicin die Menge des Rifampicin-Polymerase-Komplexes. Freies Rifampicin wurde der Lösung quantitativ durch Aktiv-Kohle entzogen, die mit Dextran überschichtet war.

Stender et al.²⁸⁾ und Wu²⁹⁾ nutzten den Unterschied der Tryptophanfluoreszenz von RNA-Polymerase in freiem Zustand und im Komplex mit Rifampicin als Signal, um die Bindung von Rifampicin an RNA-Polymerase zu verfolgen.

Übereinstimmend fanden die verschiedenen Autoren für die Bindung von Rifampicin an Holoenzym (Coreenzym) eine Bindungskonstante von $K = 3 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ ($K = 3 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} - 10^9 \text{ M}^{-1}$) und ein stoechiometrisches Verhältnis von 1 : 1.

An der Bindung von Rifampicin ist die Untereinheit β zumindest beteiligt, denn Punktmutationen im Strukturgen für β können zur Rifampicinresistenz führen. Ob und wie auch die übrigen Untereinheiten der RNA-Polymerase an der Bindung von Rifampicin beteiligt sind, soll mit Hilfe von Fluoreszenz-Titrationsexperimenten zur Bestimmung der Bindungsparameter von Rifampicin an Holoenzym, Coreenzym, β -Komplex und an die Untereinheit β im folgenden Teil der Arbeit untersucht werden.

4.2. Herleitung der für die Interpretation der Fluoreszenz- messungen notwendigen Gleichungen

4.2.1. Bestimmung der Bindungskonstanten aus den Titrations- kurven

Eine bimolekulare Reaktion wie die Bindung von Rifampicin (R) an RNA-Polymerase bzw. $\beta\alpha_2$ -Komplex (E) läßt sich im einfachsten Fall durch folgendes Schema darstellen:



k_{on} ist die Geschwindigkeitskonstante für die Bildung von ER.

k_{off} ist die Geschwindigkeitskonstante für den Zerfall von ER.

Die Bindungskonstante

$$K = \frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{off}}} \quad (54)$$

läßt sich mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes bestimmen, wenn die Konzentrationen der an der Reaktion beteiligten Komponenten bekannt sind:

$$K = \frac{c_{ER}}{c_E \cdot c_R} \quad (55)$$

Mit Gleichung (55) und den Erhaltungsgleichungen kann die Komplexkonzentration als Funktion der apparenten Bindungs-

konstante ausgedrückt werden:

$$c_{ER} = \frac{1}{2} (c_{OE} + c_{OR} + K^{-1} - \sqrt{(c_{OE} + c_{OR} + K^{-1})^2 - 4c_{OE}c_{OR}}) \quad (56)$$

Hat das Molekül E n Bindungsplätze für das Molekül R, ist in Gleichung (56) c_{OE} durch nc_{OE} zu ersetzen.

Aus der Anpassung einer gemessenen Titrationskurve an eine entsprechend Gleichung (56) berechneten können Stoechiometrie und Bindungskonstante einer Reaktion bestimmt werden.

Um entscheiden zu können, in welchem Konzentrationsbereich Fehler in den Konzentrationsbestimmungen den geringsten Einfluß auf die Bindungskonstante K haben, sind in Fig. 25 entsprechend Gleichung (56) für verschiedene Parameter Kc_{OE} Titrationskurven unter Konstanthaltung von c_{OE} gerechnet. Von Kurve zu Kurve (Hyperbeln) unterscheidet sich Kc_{OE} um den Faktor 1.1 (mit Ausnahme der Grenzkurven), so daß die relative Änderung Kc_{OE}/Kc_{OE} konstant ist. Der günstigste Konzentrationsbereich ist dort, wo das durch die Konzentrationsfehler gebildete Fehlerrechteck $\Delta(c_{ER}/c_{OE}) \cdot \Delta(c_{OR}/c_{OE})$ von der geringsten Anzahl Kurven geschnitten wird, d.h. im Bereich geringster Liniendichte.

Das Lambert-Beersche-Gesetz gilt auch für die Fluoreszenz, wenn die Absorption der Lösung bei der Exzitations- und Emissionswellenlänge unter 0.02 OD ist (s. Methoden).

Die Tryptophanfluoreszenz der RNA-Polymerase wird durch gebundenes Rifampicin erniedrigt. Diese Änderung der Fluoreszenzintensität ΔF ist proportional der Komplexkonzentration c_{ER} .

$$q \cdot \Delta F = c_{ER} \quad (57)$$

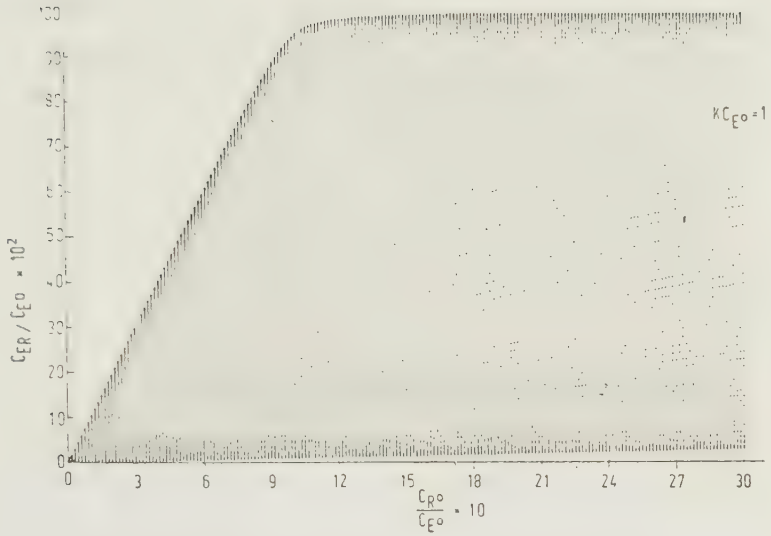


Fig. 25

Gerechnete Titrationskurven für eine bimolekulare Reaktion. Die normierte Komplexkonzentration c_{ER}/c_{O_E} ist gegen die normierte Konzentration c_{O_R}/c_{O_E} für verschiedene Parameter Kc_{O_E} aufgetragen.

$1/q$ ist ein Proportionalitätsfaktor, der molare Fluoreszenzfaktor.

Die maximale Fluoreszenzänderung ΔF_{MAX} bei totaler Sättigung des Enzyms mit Rifampicin ist:

$$\Delta F_{\text{MAX}} = \frac{c_{\text{OE}}}{q} \quad (58)$$

4.2.2. Bestimmung der Reaktionskonstanten k_{on}

Die Geschwindigkeitskonstante für die Bildung des Komplexes von $\beta\alpha_1$ (E) mit Rifampicin (R) wurde im Überschuß von Rifampicin bestimmt. Unter diesen Bedingungen kann die Rückreaktion vernachlässigt werden. Man erhält dann folgende vereinfachte Gleichung für die Komplexbildung:

$$\ln \left(\frac{c_{\text{OE}} - c_{\text{ER}}}{c_{\text{OE}}} \right) = - k_{\text{on}} c_{\text{OR}} \cdot t \quad (59)$$

Setzt man die Gleichungen (57) und (58) in (59) ein, um c_{ER} und c_{OE} durch die entsprechenden Fluoreszenzintensitäten zu ersetzen, ergibt sich:

$$\log (\Delta F_{\text{MAX}} - \Delta F) - \log \Delta F_{\text{MAX}} = k_{\text{on}} \cdot t \cdot \frac{c_{\text{OR}}}{2.3} \quad (60)$$

4.3. Resultate

4.3.1. Bestimmung der Bindungskonstanten

Die Titrationskurven zeigen die Abnahme der Tryptophanfluoreszenz von Holoenzym (Fig.26) von Coreenzym (Fig.26), $\beta\alpha$ (Fig.27) und partiell Rifampicin resistenter RNA-Polymerase Holoenzym^{pr} (Fig.28) und Coreenzym^{pr} (Fig.28) in Abhängigkeit von der Rifampicinkonzentration. Die Messungen wurden in 0.5 M KCl durchgeführt, um Aggregation der RNA-Polymerase zu vermeiden.

Die Parameter K, q und die Stoechiometrie wurden durch eine nicht lineare Anpassung⁸⁷⁾ entsprechend Gleichung (56) bestimmt. Das Ergebnis ist in Tab.3 gezeigt. Bei allen Titrationen mit Ausnahme von Holoenzym ergab sich ein stoechiometrisches Verhältnis von 1 : 1 innerhalb eines Fehlers von 10%. Da Holoenzym ($c = 5 \cdot 10^{-9}$ M) in 0.5 M KCl zu ca. 55% in Coreenzym und α -Faktor dissoziiert (s. oben), war das berechnete stoechiometrische Verhältnis verfälscht.

Da Coreenzym Rifampicin schwächer bindet als Holoenzym, ist die gemessene Bindungskonstante eine untere Abschätzung. Die Bindung an die Untereinheit β konnte ebenfalls nur abgeschätzt werden: Durch Zugabe von Rifampicin wird die Fluoreszenz der Tryptophanreste in β zwar erniedrigt, doch ist die Fluoreszenzänderung nahezu linear, d.h. viele Rifampicinmoleküle werden schwach gebunden. Total Rifampicin resistentes Enzym zeigt bei Zugabe von Rifampicin ein ähnliches Fluoreszenzverhalten wie β .

Tab. 3

Bindung von Rifampicin an RNA-Polymerase

T = 25°C in 0.05 Tris/HCl pH 7.5 und 0.5 M KCl

Enzym	K (M ⁻¹)	$\Delta F_{MAX}/F_{MAX}$	
		%	Zitat
Holo	$2.9 \cdot 10^9$	15	diese Arbeit
Holo	$3 \cdot 10^9$		Wehrli ⁷³⁾
Holo	$3.3 \cdot 10^8$	18	Wu et al. ²⁹⁾
Holo	$3.1 \cdot 10^9$	22	Bähr et al. ²⁸⁾
Core	$4.8 \cdot 10^8$	24	diese Arbeit
Core	$3.3 \cdot 10^8$	22	Wu et al. ²⁹⁾
Core	$1.6 \cdot 10^9$	22-20	Bähr et al. ²⁸⁾
β_{a2}	$6.3 \cdot 10^6$	19	diese Arbeit
β	$2 \cdot 10^3$		diese Arbeit
Core ^{prf}	$3.9 \cdot 10^7$	15	diese Arbeit
Holo ^{prf}	$3.5 \cdot 10^7$	11	diese Arbeit

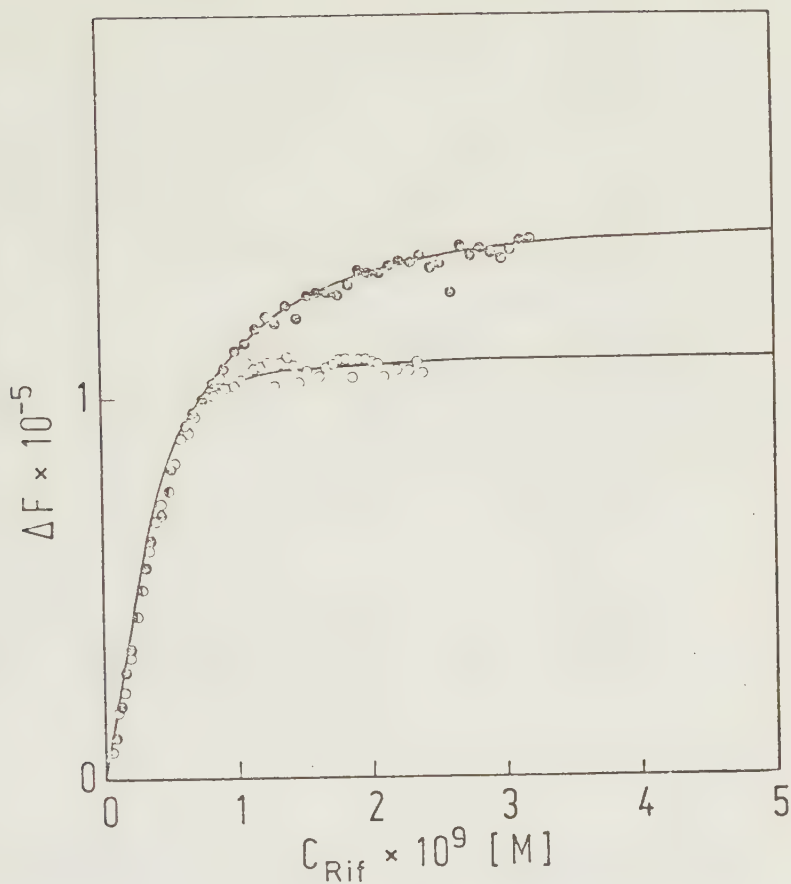


Fig. 26

Titrationen für Holoenzym ($c = 5.2 \cdot 10^{-9}$ M) (ooo) und Coreenzym ($c = 5.2 \cdot 10^{-9}$ M) (ooo) mit Rifampicin. Die Abnahme der Tryptophanfluoreszenz ΔF bei Zugabe von Rifampicin ist gegen die Rifampicinkonzentration aufgetragen.

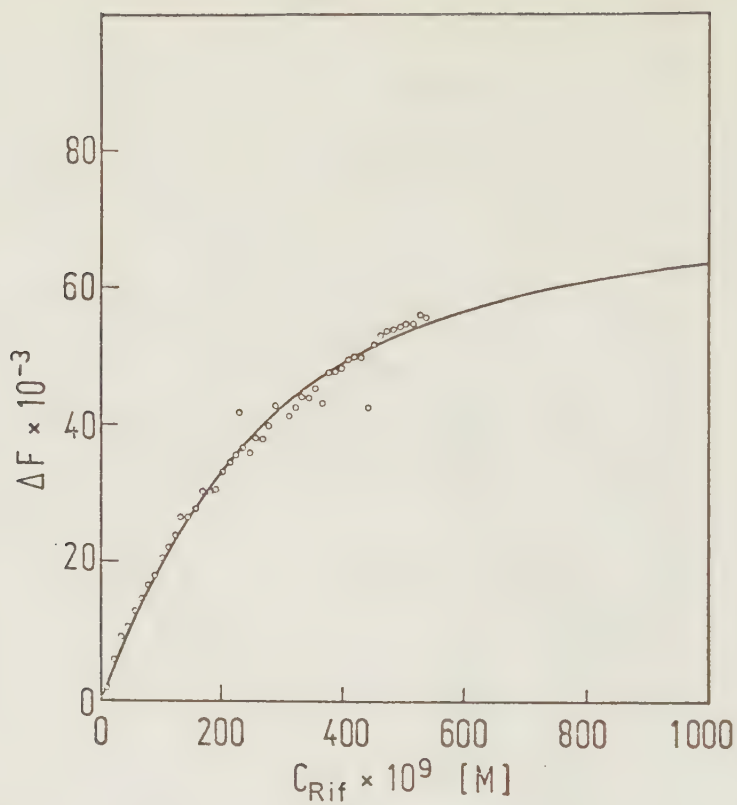


Fig. 27

Titrationsskurve für $\beta\text{-Lactamase}$ ($c = 1.7 \cdot 10^{-7} \text{ M}$) mit Rifampicin.

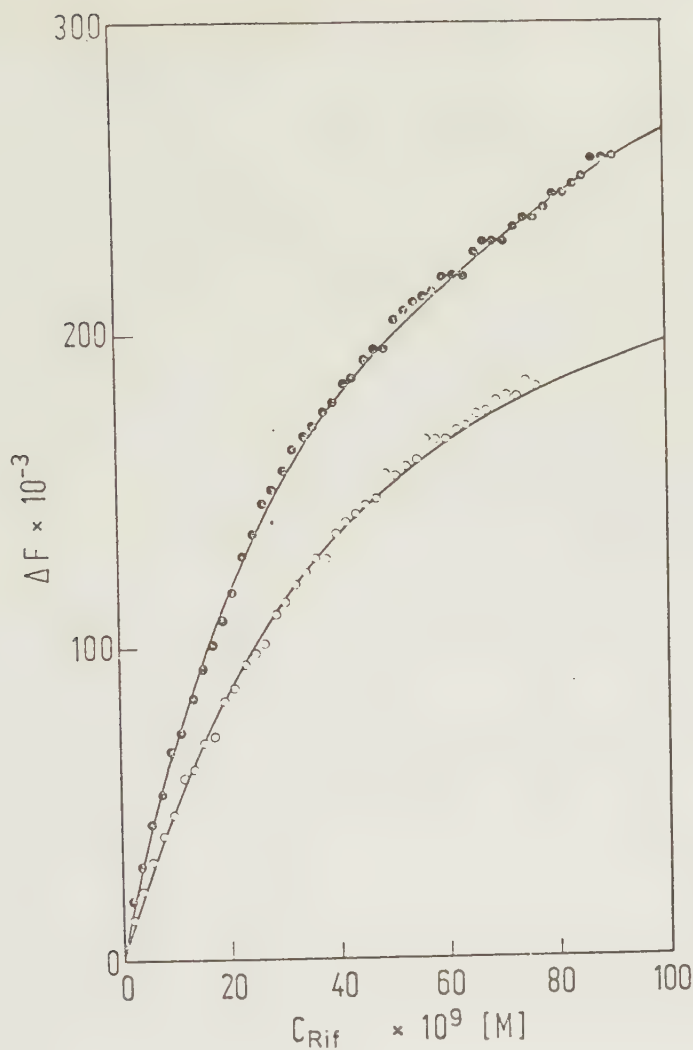


Fig. 28

Titrationen für Holoenzym (rif^{pr}) ($c = 1.9 \cdot 10^{-8} \text{ M}$) (ooo) und Coreenzym (rif^{pr}) ($c = 1.9 \cdot 10^{-8} \text{ M}$) (ooo) mit Rifampicin.

4.3.2. Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten für die Bindung von Rifampicin an $\beta\alpha_2$.

In Fig. 29 ist die Abnahme der Tryptophanfluoreszenz des Partialkomplexes $\beta\alpha_2$ nach Zugabe von Rifampicin halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Mit Gleichung (60) wurde die Reaktionskonstante k_{on} bestimmt. Nach Gleichung (54) kann mit der apparenten Bindungskonstante für den Partialkomplex $\beta\alpha_2$ die Rückreaktionskonstante k_{off} berechnet werden. In Tab. 4 sind die Ergebnisse zusammengestellt und mit von Wehrli angegebenen Geschwindigkeitskonstanten für Holoenzym und Coreenzym verglichen.

Die k_{on} -Konstante für RNA-Polymerase^{prf} liegt in derselben Größenordnung wie von $\beta\alpha_2$, ca. $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$.

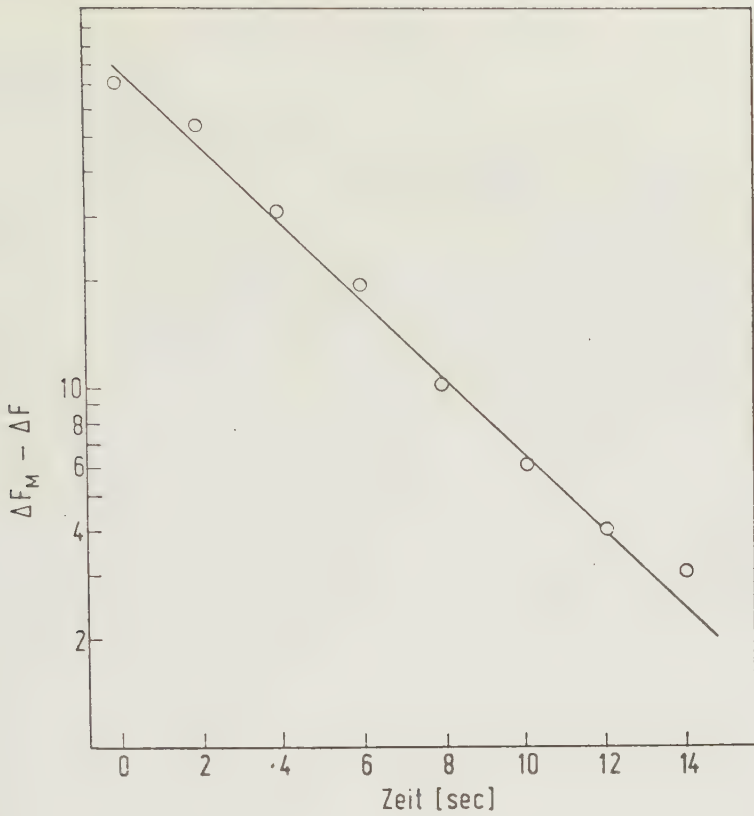


Fig. 29

Kinetik der Bindung von Rifampicin $c = 9.4 \cdot 10^{-7}$ M an β_{22}
 $c = 3.9 \cdot 10^{-8}$ M.

Tab. 4

Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die Bindung
von Rifampicin an RNA-Polymerase

Enzym	$k_{\text{on}}(\text{M}^{-1} \text{ sec}^{-1})$	$k_{\text{off}}(\text{sec}^{-1})$	$t_{1/2}(\text{sec})$	Zitat
Holo	$6 \cdot 10^5$	$4.4 \cdot 10^{-4}$	1560	Wehrli ⁷³⁾
Holo	$6 \cdot 10^5$			Bähr et al. ²⁸⁾
Core	$7 \cdot 10^5$	$4.4 \cdot 10^{-4}$	1560	Bähr et al. ²⁸⁾
β_{α_2}	$1.8 \cdot 10^8$	28.5	0.024..	diese Arbeit
Holo ^{prr}	$\lambda \cdot 10^8$	2.8		diese Arbeit

4.4. Diskussion

Die partielle Löschung (ΔF) der Tryptophanfluoreszenz ist wahrscheinlich auf einen strahlungslosen Energieübergang von Tryptophanresten des Proteins auf das gebundene Rifampicin nach dem Förster-Mechanismus zurückzuführen. Weniger wahrscheinlich ist, daß die Fluoreszenz durch eine vom Rifampicin induzierte Änderung der Polarität der Umgebung der Tryptophanreste erniedrigt wird. Denn in diesem Fall wäre neben der beobachteten Intensitätsminderung eine nicht beobachtete Verschiebung des Fluoreszenzemissionsmaximums zu erwarten⁷⁵⁾.

Die Fluoreszenz-Titrationskurven bestätigen die 1 : 1 Stoechiometrie und die Reversibilität der Rifampicinbindung. Die gemessenen Bindungskonstanten von Holoenzym und Coreenzym stimmen mit den publizierten Daten überein. Hierbei muß eingeschränkt werden, daß die gemessene Bindungskonstante für Holoenzym auf Grund partieller Dissoziation eine untere Abschätzung ist, und daß die publizierten Bindungskonstanten unter Bedingungen gemessen wurden, wo die RNA-Polymerase teilweise aggregiert vorliegt. Deswegen ist ein direkter Vergleich nicht sinnvoll.

Die gemessene Bindungskonstante für Rifampicin und Holoenzym ist um einen Faktor < 4 größer als die für Coreenzym (Tab.3). Ob σ durch direkte Nachbarschaft zum Rifampicinbindungsort die Stabilität der Rifampicinbindung erhöht, oder eine Konformationsänderung des Coreenzyms induziert, so daß die Rifampicinbindung stabiler wird, kann nicht entschieden werden. Da aber das ΔF_{MAX} von Coreenzym größer ist als das von Holoenzym, muß Abstand und Orientierung der Tryptophanreste bezüglich Rifampicin in Coreenzym und Holoenzym unterschiedlich sein.

Die Bindung von Rifampicin an den Partialkomplex $\beta\alpha_1$ ist 60 bis 70-mal schwächer als an Coreenzym. Ob β'

direkt zur Rifampicinbindung beiträgt, oder indirekt durch eine Konformationsänderung in $\beta\alpha_1$ eine Verstärkung der Rifampicinbindung bewirkt, bleibt ungeklärt. Da sich aus der Titration von $\beta\alpha_1$ mit Rifampicin auch in diesem Fall ein stoechiometrisches Verhältnis von 1 : 1 ergibt, kann man von einer spezifischen Bindung sprechen.

Die Geschwindigkeitskonstanten der Hin- bzw. der Rückreaktion von $\beta\alpha_1$ sind größer als die von Coreenzym (Tab.4). k_{on} ist annähernd diffusionskontrolliert. Offensichtlich ist der Rifampicinbindungsort im Partialkomplex $\beta\alpha_1$ besser zugänglich.

Die Untereinheit β allein bindet Rifampicin nicht mehr spezifisch: Die Bindungskonstante K ist kleiner als 10^3 M^{-1} . Ein stoechiometrisches Verhältnis konnte nicht bestimmt werden.

Aus diesen Befunden könnte man erwarten, daß es auch Rifampicin resistente α Mutanten gibt. Es könnte auch partiell Rifampicin resistente β' Mutanten geben, denn diese Untereinheit trägt mit einem Faktor von ca. 60 bis 70 zur Rifampicinbindung bei.

Solche Mutanten wären wahrscheinlich, wenn Aminosäuresequenzen der Untereinheiten α bzw. β' unmittelbar an der Bildung des Rifampicinbindungsortes beteiligt wären. Rifampicin resistente α Mutanten und partiell Rifampicin resistente β' Mutanten sind bis jetzt nicht gefunden worden. Es gibt nur Rifampicin resistente β Mutanten. Deswegen ist es wahrscheinlich, daß allein die Untereinheit β den Bindungsort für Rifampicin trägt. Die übrigen Untereinheiten induzieren wahrscheinlich Konformationsänderungen in der Untereinheit β und bewirken so die dargestellte Abhängigkeit der Stärke der Rifampicinbindung von der Zusammensetzung des Komplexes. Mutante Untereinheiten, die diese Konformationsänderungen in β nicht induzieren können, sind offensichtlich so geschädigt, daß sie letal sind.

RNA-Polymerase aus einem partiell Rifampicin resistenten Stamm bindet Rifampicin spezifisch, d.h. im stoechiometrischen Verhältnis von 1 : 1, wenn auch um einen Faktor 100 schwächer als die des Wildtyps. Sowohl vom Wildtyp wie auch aus dem partiell Rifampicin resistenten Stamm hat keinen Einfluß auf die Stabilität der Rifampicinbindung. Die prozentuale Fluoreszenzänderung $\Delta F_{\text{Max}}/F$ ist für Core-enzym größer als für Vollenzym, ähnlich wie im Fall des Enzyms des Wildtyps. Die Hinreaktion der Rifampicinbindung ist im Gegensatz zu derjenigen des Wildtypenzyms annähernd diffusionskontrolliert. In dieser Polymerase-Mutante muß der Rifampicinbindungsort so verändert sein, daß die Bindung von Rifampicin sterisch weniger behindert ist als im Wildtypenzym, ähnlich wie beim Partialkomplex β_{α_1} des Wildtypenzyms.

Für Wildtypenzym ist die Verminderung der Transkriptionsrate in Abhängigkeit von der Rifampicinkonzentration proportional der Fluoreszenzlöschung in einem Titrations-experiment, das unter denselben Bedingungen wie der Aktivitätstest durchgeführt wurde. Im Aktivitätstest wurde also wie in einer Momentaufnahme die Konzentration aktiver Enzymmoleküle gemessen. Für die RNA-Polymerase aus dem partiell Rifampicin resistenten Stamm gilt die Proportionalität zwischen Inhibitionsrate und Fluoreszenzlöschung nicht. Für den Aktivitätstest braucht man für eine 50%tige Inhibierung einen 200fachen Überschuß an Rifampicin über RNA-Polymerase^{prr}. Bei den Titrationsexperimenten liegen 50% der Enzymmoleküle als Polymerase^{prr}-Rifampicin-Komplex bei einem 2fachen Überschuß an Rifampicin vor. Dieses Verhalten von RNA-Polymerase^{prr} im Aktivitätstest und im Titrationsexperiment ist erklärbar, wenn man annimmt, daß

die Bindung von Rifampicin und die Bildung des Elongationskomplexes konkurrierende Prozesse sind. Sobald die Polymerase^{prr} im Elongationskomplex nicht mehr Rifampicin bindet, wie Aktivitätsmessungen^{71,94)} und Bindungsstudien mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen an Coreenzym im Elongationskomplex zeigen, wird sich durch Dissoziation des Rifampicin-Polymerase^{prr}-Komplexes ein neues Gleichgewicht einstellen. Die Dissoziationsgeschwindigkeit ist für die RNA-Polymerase^{prr} viel größer als für Wildtypenzym. Deswegen erscheint RNA-Polymerase^{prr} im Aktivitätstest viel resistenter als auf Grund der Bestimmung an freiem Enzym durch das Titrationsexperiment zu erwarten ist.

5. Material und Methoden

5.1. Material

5.1.1. RNA-Polymerase

Die RNA-Polymerase E. coli K 12, W 3350 str Rrif R 15 (rif^{Pr}); W 3350 str R rif R 16 (rif^r) (Voß, Eagan) wurde nach der Methode von Zillig et al.⁷⁶⁾ mit kleinen Modifikationen gereinigt: TAG-Puffer (ohne MgCl₂) wurde statt TMAG benutzt. Nur eine zonal Zentrifugation bei hoher Ionenstärke (0.5 M NH₄ Cl in TA) wurde durchgeführt. Coreenzym und σ -Faktor wurden nach Burgess⁷⁷⁾ isoliert.

5.1.2. DNA

T7-Phagen wurden durch einen diskontinuierlichen CsCl Gradienten-Zentrifugation⁷⁸⁾ mit anschließender Gleichgewichtszentrifugation gereinigt. Die Konzentration der DNA wurde durch Absorptionsmessung bei 260 nm bestimmt ($\epsilon_{260}^{1\%} = 20$).

5.1.3. Inhibitoren

Heparin und Rifampicin wurden von der Fa. Ciba gekauft. Die Konzentration der Rifampicinlösungen wurden durch Absorptionsmessung bei 334 nm bestimmt. ($\epsilon_m = 2.8 \cdot 10^4$)⁷⁹⁾. Ein Molekulargewicht von 13000⁷⁶⁾ wurde für Heparin angenommen.

5.1.4. Präparation der RNA aus Rattenleber

Die RNA aus Rattenleber wurde nach Kirby⁹⁰⁾ isoliert.

5.2. Methoden

5.2.1. Bestimmung des C-Gehaltes von Coreenzym durch Elementar-Analyse

Ungefähr 10mg Coreenzym wurden dialysiert gegen 10^{-5} M Phosphat-Puffer pH 7.5, und dann lyophilisiert. 3 mg Protein wurde mit einem Perkin Elmer 240 Elementar-Analyser analysiert.

5.2.2. Absorptionsmessungen

Absorptionspektren wurden in einem Gilford-Spektrometer in einer Quarz-Kuvette von 1 cm Weglänge vermessen. Alle Messungen wurden in einem Puffer von 0.05 M Tris/HCL pH 7.5 mit 0.4 M KCl durchgeführt. Die Protein-Konzentration war ca. 1 mg pro ml.

5.2.3. Lichtstreuungen

Die Lichtstreuungen wurden in einem digitalen Fluoreszenzspektrometer bei einer Wellenlänge von 350 nm mit dem Photomultiplier in der 90° Position durchgeführt. Um artifizielle Streuung durch Staub und Bläschen zu vermeiden, wurden alle Puffer gefiltert und entgast. Protein wurde über Sephadex G 25 gefiltert, das mit staubfreiem Puffer gewaschen worden war. Die DNA-Lösungen wurden 5 min bei 20 000 upm zentrifugiert.

Dimerisationsmessungen wurden in einer Mikro-Fluoreszenz-kuvette (Quarz, Dimension 5 mm × 5 mm, Volumen 0.5 mm, Hellma, Müllheim) durchgeführt. Die Proteinkonzentrationen waren ca. 0.1 mg/ml. Alle Messungen wurden bei 25° C in 0.05 M Tris/HCL Puffer pH 7.5 durchgeführt. Die Ionenstärke (μ) wurde durch Zugabe von KCl eingestellt. Die effektive Ionenstärke ist: $\bar{\mu} = \mu_{\text{tot}} + \mu_{\text{Puffer}}$, wobei $\mu_{\text{Puffer}} = 0.023$ ist.

5.2.4. Transkriptionsexperimente

Die folgenden Inkubationsmischungen und Bedingungen wurden für alle Transkriptionsexperimente verwendet. T7 DNA-Lösung und RNA-Polymerase wurde bei 37° C für 10 min. in einem 0.05M Tris-HCl-Puffer pH 7.5 mit 0.05 M KCl und 0.007 M MgCl (niedrige Ionenstärke: NS) oder 0.13 M KCl und 0.03 M MgCl (hohe Ionenstärke: HS) inkubiert. Die Nukleosidtriphosphate wurden bei 37° C in dem gleichen Puffer mit denselben Salzkonzentrationen, die für Inkubationsmix verwendet wurden, vorgewärmt. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Nukleosidtriphosphate zum Inkubationsmix gestartet. Die Endkonzentration der Nukleosidtriphosphate war 10^{-3} M, die der T7-DNA 0.2 mg/ml für die Lichtstreuungs- und die Radioaktivitätsmessungen, für die RNA-Bestimmung auf Agarosegel 0.8 mg/ml und die der RNA-Polymerase für die Lichtstreuungs- und die Radioaktivitätsmessungen 4 - 16 µg/ml, für die Analyse auf Agarosegel 50 µg/ml.

5.2.4.1. Radioaktiver Einbautest

Der radioaktive Einbaute⁷⁶⁾st wurde nach Zillig⁷⁶⁾ et al. durchgeführt.

5.2.4.2. Der Lichtstreutest

Der Inkubationsmix wurde in einer Mikrofluoreszenzzelle (5×5×25 mm, notwendiges Volumen 0.5 ml), in einem thermosatisierten Küvettenhalter präinkubiert. Die Reaktion wurde durch Mischung der Nukleosidtriphosphate und des Inkubationsmix per Hand in der Fluoreszenzküvette gestartet. In den Fällen, in denen diese Mischprozedur nicht genügend schnell war, wurde eine einfache Stoppedflow-Apparatur (Totzeit~1 sec) benutzt⁸¹⁾, um die RNA-Synthese unmittelbar nach dem Start der Reaktion verfolgen zu können: Inkubationsmix und Nukleosidtriphosphate wurden getrennt in zwei 3 ml Spritzen präinkubiert, die in einem

thermostatisierten Alu-Block eingebettet waren. Die Reaktion wurde gestartet durch Entleerung des Inhalts beider Spritzen. Die Lösungen wurden in einem T-förmigen Verbindungsstück gemischt mit einem inneren Durchmesser von 1 mm und durch einen dünnen Plastikschauch in eine kommerzielle Fluoreszenz-Mikro-Durchflußzelle (Helma, Müllheim, Deutschland) mit einem Volumen von 0.1 ml (3×3×9 mm) gedrückt.

Ca. 0.4 ml totales Volumen waren für einen Test notwendig.

Die winkelabhängigen Streumessungen wurden in einem kommerziellen Lichtstreuinstrument (Ficka) durchgeführt.

5.2.5. Agarosegelelektrophorese (Plattengel) zur Analyse der RNA aus einem Transkriptionsansatz

Es wurde die Plattengelapparatur nach Studier⁹¹⁾ benutzt. Als Lauf- und Elektrodenpuffer wurde ein Tris-EDTA-Borat-Puffer verwendet: 0.09 M Tris und 0.04 M EDTA wurden mit Borsäure auf pH 8.3 titriert. Zum Anfärben der RNA wurde dem Puffer Ethidiumbromid ($c = 0.005 \text{ mg/ml}$) zugegeben. 1% ige Agarose geschmolzen im Laufpuffer wurde zwischen die durch einen Stempel abgeschlossenen Platten gegossen. Das Agarosegel (Sicam) war 1%ig.

Vorbereitung der Proben: Zu den angegebenen Zeiten wurden je 50 μl des Transkriptionsansatzes durch Abkühlung auf 0° C gestoppt. Die DNA im Ansatz wurde mit 5 μg DNAase (elektrophoretisch gereinigt, frei von RNAase von Worthington) 30 min. lang hydrolysiert, um eine Retardierung der RNA durch die DNA auf dem Gel zu vermeiden. Verbreiterung der RNA-Banden durch Salzeffekte und Interaktion von RNA mit RNA-Polymerase wurde durch Dialyse des Ansatzes für ca. 60 min. gegen 0.01 % SDS vermieden.

Das Dialysat (ca. 50 μ l) wurde mit 10 μ l Glyzerin und 5 μ l Ethidiumbromid ($c = 0.5$ mg/ml) versetzt, auf das Gel aufgetragen, und für 5 Stunden bei 50 V elektrophoretisiert. Alle Reagenzien des Transkriptionsansatzes wurden durch Inkubation mit RNA aus Rattenleber auf Verunreinigung durch RNAase überprüft.

5.2.5. Neutronenstreuungsmessungen

Die Neutronenkleinwinkelmessungen wurden mit Hilfe der Kleinwinkelapparatur D11 A des Hochflußreaktors des Instituts Laue-Langevin in Grenoble/Frankreich durchgeführt ⁸²⁾. Die RNA-Polymerase ($c = 1.8 \cdot 10^{-5}$ M) wurde unter denselben Pufferbedingungen vermessen, die für die Lichtstreuungsmessungen benutzt wurden. Um Fluktuationen des Detektors und der Monitorelektronik zu kontrollieren, wurden die Messungen in Perioden von 20 min. 3 mal wiederholt. Die Messungen wurden in Quarzküvetten mit einem Durchmesser von 8 mm und einer Weglänge von 1 mm durchgeführt. Eine Wellenlänge von 1 nm wurde mit Hilfe des Geschwindigkeitsselektors aus der Maxwell-Verteilung der kalten Neutronenquelle selektiert. Der Bereich des Impulsübertragungsvektors (α) war $0.05 \leq \alpha \leq 0.5$. Die Streuintensität beim Winkel 0 wurde durch Extrapolation der Streukurve zum Winkel 0 ermittelt. Jede Detektorzelle wurde korrigiert für ungleiche Empfindlichkeit des 64x64 Anodengitters mit Hilfe der inkoherenten, isotropen Streuung von H₂O. Die Stabilität der Streuapparatur und des Reaktors wurde zusätzlich mit einem Teflon-Standard kontrolliert.

5.2.7. Ermittlung des molaren Extinktionskoeffizienten von Coreenzym, σ -Faktor und Holoenzym

Die Konzentration von Coreenzym zur Ermittlung des molaren Extinktionskoeffizienten wurde durch Einwaage bestimmt. Um das Gewicht von festgebundenem Wasser zu berücksichtigen, wurde der C-Gehalt bestimmt und mit dem auf Grund der Brutto-Aminosäure-Bestimmung⁸³⁾ errechneten Wert verglichen:

$$C_{\text{gemessen}} = 53.8\%$$

$$C_{\text{berechnet}} = 54.4\%$$

Die Konzentration von σ wurde aus einer Fluoreszenztitrationskurve einer bekannten Menge Coreenzym mit σ bestimmt (s. Fig. 30). Da Coreenzym an σ stark gebunden ist, ist die äquivalente Menge an σ durch den Knick am Äquivalenzpunkt bestimmbar.

Der σ -Gehalt von Holoenzym rekonstituiert aus Coreenzym und σ mit der oben beschriebenen Methode, wurde verglichen mit dem σ -Gehalt von Holoenzym, das als Fraktion von einer Phosphor-Zellulose-Säule erhalten wurde. Die in 6 M Harnstoff auf Zelluloseazetatstreifen getrennten Untereinheiten wurden angefärbt, ausgeschnitten und ihre Absorption gemessen. Beide Fraktionen Holoenzym hatten den gleichen σ -Gehalt.

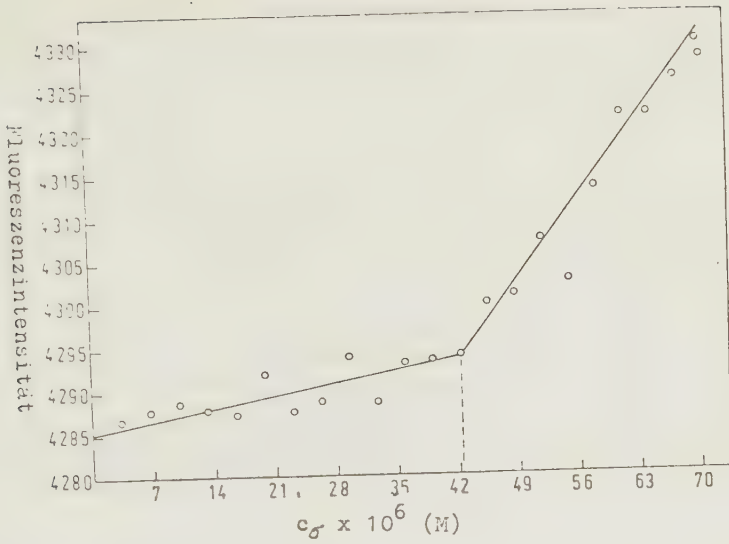


Fig. 30

Fluoreszenztitrationskurve (Exzitation: 278 nm; Emission: 350 nm) von Coreenzym ($c = 4.2 \cdot 10^{-7}$ M) mit σ -Faktor bei einer Ionenstärke von $\mu = 0.3$.

5.2.8. Titrationsexperimente zur Bestimmung der Rifampicinbindung

Die Titrationskurven wurden in einem selbstgebauten Fluoreszenzspektrometer mit impulsgesteuerter Titrationsapparatur erstellt. Zu einer Proteinlösung ($c = 2.6 - 100 \mu\text{g/ml}$) in 2.6 ml 0.05 M Tris/HCl-Puffer pH 7.5 wurde in Schritten von $5 \mu\text{l}$ 0.12 ml Rifampicin aus einer schrittmotorgesteuerten Hamilton-spritze zugesetzt und in der Küvette gemischt. Nach einer Pause von ca. 5 min wurde die Tryptophanfluoreszenz (Exzitation 278 nm, Emission 350 nm) gemessen. Um Oberflächendenaturierung gering zu halten, wurde allen Lösungen 0.001% Brij zugesetzt.

5.2.9. Fluoreszenzkorrekturen

Um Abweichungen vom Lambert-Beerschen Gesetz (das analog auch für die Fluoreszenz gilt) auf Grund der Absorption von RNA-Polymerase und Rifampicin bei der Exzitationswellenlänge (Innerfiltereffekt)⁹²⁾ bzw. der Emissionswellenlänge (Reabsorption)⁹²⁾ kleinzuhalten, wurde eine spezielle Geometrie für das durchstrahlte Kuvettenvolumen gewählt (s. Fig. 31).

Abweichungen von der Proportionalität der Konzentration und der Fluoreszenz wurden mit Hilfe einer Gleichung korrigiert, die die Absorption bei der Exzitation- und Emissionswellenlänge berücksichtigt. In Fig. 32 ist die Fluoreszenz eines Farbstoffes (Xanthen) in Abhängigkeit von der Absorption bei der Exzitationswellenlänge aufgetragen. Die Punkte sind durch eine quadratische Funktion angepaßt. Aus dieser Gleichung ist die Korrektur R_{IF} der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Absorption (OD) zu entnehmen.

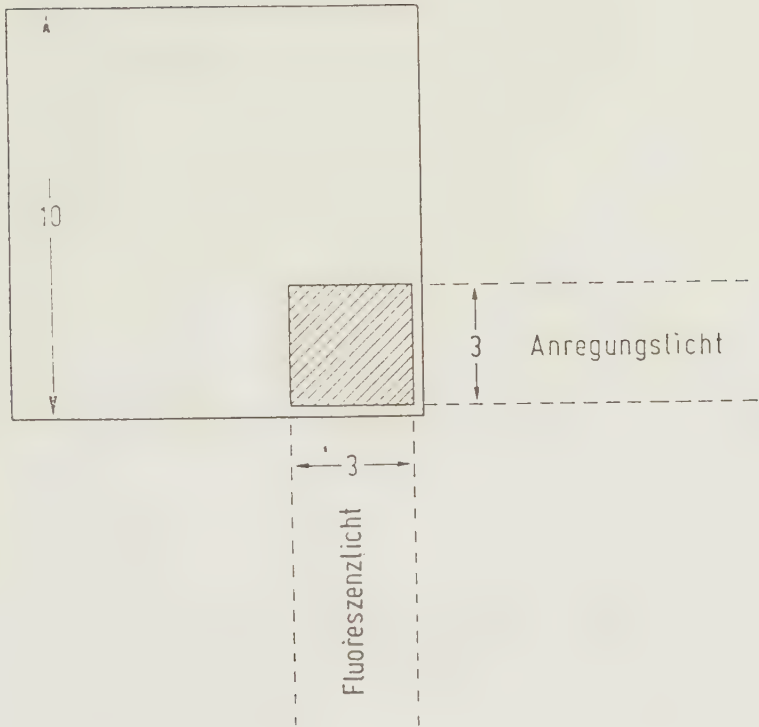


Fig. 31

Geometrie des Strahlengangs in der Fluoreszenzkuvette zur Verminderung von Reabsorption und Innerfiltereffekt.

22: wirksames Fluoreszenzvolumen.

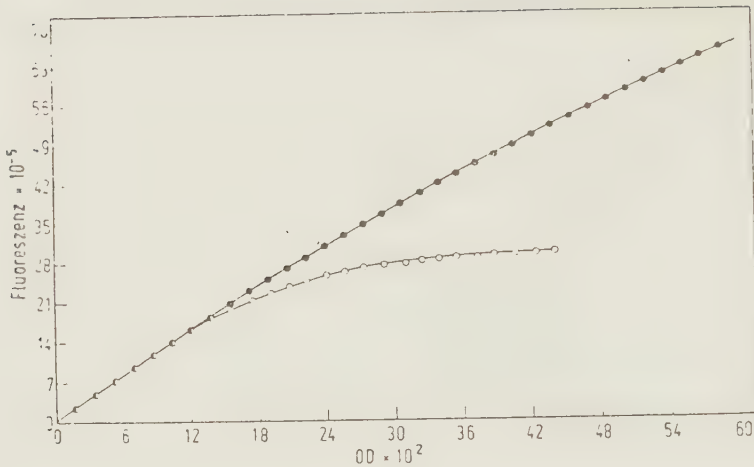


Fig. 32

Abhängigkeit der Fluoreszenz von der optischen Dichte (OD) bei der Exzitationswellenlänge zur Korrektur des Innerfiltereffekts: (●●●) normale Geometrie des Strahlengangs d.h. das wirksame Fluoreszenzvolumen liegt im Zentrum der Kuvette; (ooo) Geometrie des Strahlengangs wie in Fig.31 gezeigt.

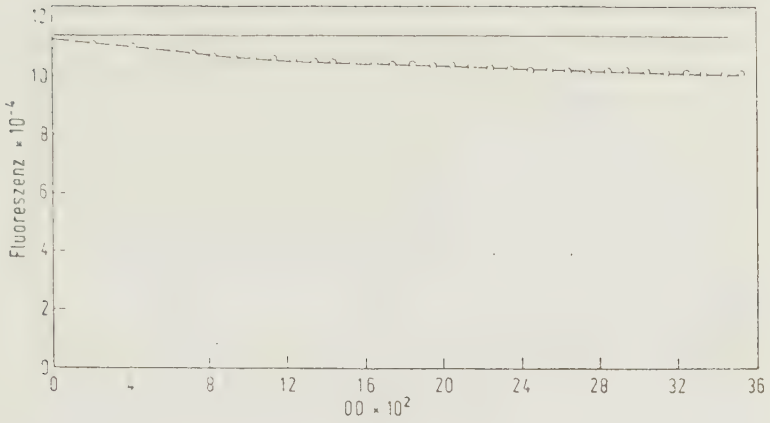


Fig. 33

Abhängigkeit der Fluoreszenz von der optischen Dichte (OD) der Lösung bei der Emissionswellenlänge zur Ermittlung der Reabsorptionskorrektur. Küvettengeometrie wie in Fig. 31.

In derselben Weise wird die Korrektur R_{RA} für die Reabsorption durchgeführt (s. Fig. 33):

$$R_{RA} = \frac{1}{1 - 0.599 \text{ OD} + 0.611 \text{ OD}^2} \quad (62)$$

6. Zusammenfassung

6.1. Transkription kann durch Messung der durch die naszierende RNA verursachten Lichtstreuung kontinuierlich verfolgt werden. Mit dieser Methode ist es möglich auch kleine Änderungen der Syntheserate mit im Vergleich zu anderen Transkriptionstests geringem Aufwand an Zeit und Material zu bestimmen. Um die Lichtstreuungsmethode als Transkriptionstest einzuführen, wurde sie mit etablierten Methoden verglichen: dem Einbautest, bei dem die in die säureunlösliche RNA eingebaute Menge an radioaktiv markierten Nukleosidtriphosphaten in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer bestimmt wird, und einem Gelelektrophoresetest, bei dem die Größe der synthetisierten RNA in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer auf einem Agarosegel analysiert wird. Die mittels Lichtstreuung gemessenen Kinetiken zeigen innerhalb der Fehlergrenzen denselben Verlauf wie die mit dem Einbautest bestimmten Kurven. Das gilt sowohl für die bei niedriger Ionenstärke gemessenen Transkriptionskinetiken, wo der Transkriptionszyklus in erster Näherung nur einmal durchlaufen wird, als auch für die bei hoher Ionenstärke gemessenen Kinetik, wo sich der Transkriptionsablauf zyklisch wiederholt.

In den mit Hilfe der Lichtstreuung bei niedriger Ionenstärke gemessenen Kinetiken kann man auf Grund der gegenüber dem Einbautest größeren Signifikanz der Daten zwei Phasen unterscheiden: die erste ist nach 110 sec. beendet. Diese Zeit entspricht dem Ende der ersten Transkriptionsrunde: die gelelektrophoretische Analyse der T7-m-RNA in Abhängigkeit von der Zeit zeigt, daß nach ca. 2 min. die T7-m-RNA mit einem Molekulargewicht von $2.2 \cdot 10^6$ fertig synthetisiert ist. Aus diesen Daten wurde eine durchschnittliche Kettenwachstumsgeschwindigkeit von 65 Nukleotiden/sec./Kette berechnet.

Nach 110 sec. beginnt bei niedriger Ionenstärke eine Phase reduzierter RNA-Synthese. Ein Teil der RNA-Produkte dieser Phase wird von Polymerasemolekülen synthetisiert, die über den "20% - Terminator" hinweglesen. Ein anderer Teil wird von reinitiiierenden oder langsam startenden Polymerasemolekülen synthetisiert.

Die Empfindlichkeit des Lichtstreutests ist vergleichbar der des Einbautests, wenn man ^{14}C -ATP mit einer spezifischen Aktivität von 0.1 Ci/Mol benutzt. Die Empfindlichkeit des Lichtstreutests ist begrenzt durch die Untergrundstreuung der DNA der RNA-Polymerase in Staubpartikeln im Transkriptionsansatz.

Für die frühe T7-mRNA wurde ein Streumassenradius von $R = 47 \text{ nm}$ bestimmt, dem eine streuäquivalente Kugel mit einem Radius $r = 60 \text{ nm}$ zugeordnet werden kann.

Für eine genauere Interpretation der Lichtstreudaten wurde eine Streufunktion entwickelt, mit der die Streubeiträge der verschiedenen Partikel im Transkriptionsansatz abgeschätzt wurde.

Mit einigen vereinfachenden Annahmen über die Form der DNA und des Polymerase-RNA-Komplexes (P-R-Komplex) wurden die Drehmomente und die Reibungskräfte, die während der Elongation auf die DNA und den P-R-Komplex wirken, berechnet, mit dem Ziel, abschätzen zu können, ob sich auch in vitro die RNA im Komplex mit der Polymerase während der Elongation um die DNA dreht. Die Rechnung zeigt, daß die Drehmomente um mehrere Größenordnungen kleiner als die Reibungskräfte sind. Bei einem molaren Enzym/DNA Verhältnis von 1 ist die während der Drehung auf die DNA wirkende Reibungskraft 65 mal größer als die, die auf den P-R-Komplex wirkt. D.h. bei niedrigem molarem Enzym/DNA Verhältnis wird sich im wesentlichen der P-R-Komplex um die DNA drehen.

6.2. Das Monomer-Dimer-Gleichgewicht von Holoenzym wurde in Abhängigkeit von der Ionenstärke mittels Lichtstreuungsmessung untersucht. Die Ionenstärkeabhängige Bindungskonstante $K(\mu)$ läßt sich durch folgende Gleichung ausdrücken:

$$K(\mu) = 2 \cdot 10^7 e^{-30.5\mu}$$

Geschwindigkeitskonstanten für dieses Gleichgewicht wurden für zwei Ionenstärken abgeschätzt: für $\mu = 0.05$ ist $k_{on} \leq 1.3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, für $\mu = 0.4$ ist $k_{off} \leq 0.2 \text{ sec}^{-1}$. Das Gleichgewicht von $E + \sigma \rightleftharpoons E\sigma$ kann bei hoher Ionenstärke mit Hilfe der Lichtstreuung untersucht werden: für $\mu = 0.5$ ist $K = 1.7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$, bei niedriger Ionenstärke ($\mu = 0.024$) wurde die Bindungskonstante abgeschätzt: $K > 5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$. Obwohl das Monomer-Dimer-Gleichgewicht dem $E + \sigma \rightleftharpoons E\sigma$ -Gleichgewicht überlagert ist, lassen sich bei den gewählten Konzentrationsbedingungen beide Gleichgewichte getrennt behandeln. Bei niedriger Ionenstärke ist das $E + \sigma \rightleftharpoons E\sigma$ -Gleichgewicht ganz auf die Seite des Holoenzym verlagert. Deswegen läßt sich das in diesem Ionenstärkebereich wirksame Monomer-Dimer-Gleichgewicht ohne Berücksichtigung der Dissoziation von Holoenzym in Coreenzym und σ -Faktor behandeln. Bei hoher Ionenstärke sind Holoenzym wie auch Coreenzym monomer. Eine nicht lineare Zunahme der Lichtstreuung von Coreenzym bei Zugabe des σ -Faktors wird deswegen allein durch die Bindung von σ -Faktor an Coreenzym verursacht.

Der Einfluß von Transkriptionsinhibitoren und von T7-DNA auf den Grad der Dimerisation von Holoenzym wurde untersucht: Rifampicin hat keinen Einfluß auf das Monomer-Dimer-Gleichgewicht. Heparin führt zu einer Monomerisierung von Holoenzym bei niedriger Ionenstärke. An T7-DNA ist Holoenzym als Monomer gebunden.

6.3. Die Bindung von Rifampicin an Holoenzym, Coreenzym, den Partialkomplex $\beta\alpha_2$, die Untereinheit β , an partiell Rifampicin resistente RNA-Polymerase und an total resistente RNA-Polymerase wurde durch Fluoreszenzmessungen untersucht. Als Signal wurde die durch die Bindung von Rifampicin verursachte partielle Löschung der Fluoreszenz von Tryptophanresten im Protein verwendet. Bindungskonstanten und Stoechiometrie wurden aus entsprechenden Titrationskurven bestimmt. Die Ergebnisse sind:

Partikel	K(M ⁻¹)
Holoenzym	$2.9 \cdot 10^9$
Coreenzym	$4.8 \cdot 10^8$
$\beta\alpha_2$	$6.3 \cdot 10^6$
β	$> 10^3$
Holoenzym ^{pr}	$3.5 \cdot 10^7$
Coreenzym ^{pr}	$3.0 \cdot 10^7$

In allen Fällen außer bei β wird ein Rifampicinmolekül pro Partikel gebunden. Für die Untereinheit β konnte keine spezifische Bindung von Rifampicin festgestellt werden, für Holoenzym war das aus einer Titrationskurve berechnete stoechiometrische Verhältnis auf Grund partieller Dissoziation in Coreenzym und σ -Faktor verfälscht.

Die Hinreaktionskonstante k_{on} für die Bindung von Rifampicin an den Partialkomplex $\beta\alpha_2$ und an partiell Rifampicin resistente RNA-Polymerase ist annähernd diffusions kontrolliert. Aus genetischen Befunden und der oben aufgezeigten Abhängigkeit der Rifampicinbindung von der Zusammensetzung des Enzyms kann man wahrscheinlich machen, daß die Untereinheit β den Bindungsort für Rifampicin trägt, und daß die übrigen Untereinheiten Konformationsänderungen in der Untereinheit bewirken und in dieser Weise indirekt an der Bildung des Rifampicinbindungsortes beteiligt sind.

- 1) Weiss, S.E. and Gladstone, L. (1959) *J.Amer.Chem.Soc.*81, 4118 - 4126.
- 2) Hurwitz, I., Bresler, A. and Kaye, A. (1959) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1, 3 - 12.
- 3) Hurwitz, J. August, I.T., (1963) *Prog. Nuc. Ac. Res.* 1, 59 - 68
- 4) Hartmann, G., H.O. Honikel, R., Knüsel und J. Nuesch (1967) *Biochem. Biophys. Acta* 145, 843 - 856
- 5) Burgess, R. (1976) RNA-Polymerase, in Cold Spring Harbor Laboratory 69 -100
- 6) Zillig, W., K. Zechel und H. Halbwachs (1970) *Hoppe-Seyler Z. Physiol. Chemie* 351, 221 - 225
- 7) Walter, G., W. Seifert und W. Zillig (1968) *BBRC* 30, 240 -246
- 8) Burgess, R. (1969) *Chem.* 244, 6168 -6175
- 9) Heil, A. und W. Zillig *FEBS Letters* 11, 165 -172
- 10) Khesin, R.B., Zh. M. Gorlenko, M.F. Shemayakin, S.L. Stvolinsky S.Z. Minlin und T.S. Ilyina (1969) *Mol. Gen. Genet.* 105, 243 - 249
- 11) Sethi, V.S. und W. Zillig (1970) *FEBS Letters* 6, 339 - 345
- 12) Fukuda, R. und A. Ishiama (1974) *J. Mol. Biol.* 87, 523 - 542
- 13) Zillig, W., E. Fuchs, P. Palm, D. Rabussay u. K. Zechel (1970) In *Lepetit colloquium on RNA Polymerase and transcription* (ed. L. Silvestry vol. 1. pp. 151 - 157, North-Holland, Amsterdam
- 14) Zillig, W., K. Zechel, D. Rabussay, M. Schachner, V.S. Sethi, P. Palm, A. Heil und W. Seifert (1971) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 35, 47 -61
- 15) Stender, W., A. A. Stütz und H.H. Scheit (1975) *Eur. J. Biochem.* 56, 129 - 134
- 16) Frischauf, A.A. und K.H. Scheit (1973) *BBRC* 53, 1227 -1232
- 17) Armstrong, V.H. Sternbach und F. Eckstein *Abstr. Comm. 9th Meet. Fed. Eur. Biochem. Soc., Budapest*, p 176
- 18) Mailhammer, R.H.L. Yang, G. Reiness und G. Zubay (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72, 4928 -4936
- 19) Rabussay, D. und W. Zillig (1969) *FEBS Letters* 5, 104 - 108
- 20) Krakow, J.S. und K. von der Helm (1971) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 35, 73 - 81

- 21) Antony, D.D., E. Zeszotek, D.A. Goldthwait (1966) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 56, 1026 - 1035
- 22) Johnston, D.E., Mc Clure, W.R. (1976) in *RNA Polymerase* p413 -420, Cold Spring Harbor Laboratory
- 23) Richardson, J.F., (1966) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 55, 1616 - 1623
- 24) Berg, D. und Chamberlin M. (1970) *Biochemistry* 3, 5055 -5064
- 25) Novak, R.L. und Doty (1970) *Biochemistry* 9, 1739
- 26) Beabealashvilly, R.Sh.V.I. Ivanow, L.E. Minchenkoya und L.P. Savottchina (1972) *Biochem. Biophys. Acta* 253, 35 - 44
- 27) Pilz, J., Kratky, O. and Rabussay, D. (1972) *Eur. J. Biochem.* 28, 205 -220
- 28) Bähr, W. Stern, W., Scheit K.H. und Jovin T.M. (1976) in *RNA Polymerase* p. 369 - 396 Cold Spring Harbor Laboratory
- 29) Yarbrough, L.R., F.Y. - H. Wu und C.-W Wu (1976) *Biochem.* 15, 2669 - 2776
- 30) Stacey, K.A. (1956) *Light Scattering in Physical Chemistry* Academic Press, New York.
- 31) Geiduschek, E.P. and Holtzer, A., (1958) *Adv. Biol. Med. Phys.* 6, 431 -452
- 32) Mc.Intyre, D. und Kornich, F. Eds, *Light Scottering from Dilute Polymer Solutuons* (1964) Gordon and Breach, New York
- 33) Casava, E.F. and Eisenberg, H. (1964) *Adv. Protein Chem.* 19, p. 287 - 405
- 34) Debye, P. (1915) *Ann. Phys.* 46, 809 - 817
- 35) Hinkle, D.C., Chamberlin M.J. (1972) *J. Mol. Biol.* 70, 187 -195
- 36) Porod, G. (1949) *Monatsh. Chem.* 80, 251 - 252
- 37) Kratky, O. and Porod, G. (1949) *Rec. Trav. Chim. Pays.-Bas.* 1106-1119
- 38) Landau, L. and Lifschitz, E. (1959) *Statistical Physics* Pergamon, Oxford, p 478 - 481
- 39) Debye, P. (1947) *J. Phys. Chem.* 51, 18 -26
- 40) Flory, J.P. (1969) *Statistical Mechanics of Chain Molecular* Wiley-Interscience, New York

- 41) Bloomfield, V.A. Crothers, D.M. and Tinoco, Jr. (1974) *Physical Chemistry of Nucleic Acids*, Harper and Row, New York, p. 191 - 192
- 42) Millette, R.L. Trotter, C.D. Herrlich, P. and Schweiger, H. (1970) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 35, 135 - 142
- 43) Maitra, U. Lockwood, A.H. Dubnoff, J.S. and Guha, A. (1970) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 35, 143 - 156
- 44) Guinier, A. und Fournet, G. (1955) *Small angle scattering of rays*, John Wiley and Sons, London
- 45) Eisenberg, H. (1975) *J. Polymer. Sci.* 51, 57 - 68
- 46) Chamberlin, M., (1974) in *The Enzymes* ed Boyer, P.D. Academic press Vol. 10, 333 - 374
- 47) Freifelder, D., (1970) *J. Mol. Biol.* 54, 567 - 577
- 48) Stevens, A. Emery jr. A.J. und Sternberger N. (1966), *BBRC* 24, 929 - 936
- 49) Schulte, C., Morrison, C.A. und Garret, R.A. (1974) *Biochem.* 13, 1032 - 1037
- 50) Herbeck, R. und Zundel, G., (1976) *BBA* 418, 52 - 62
- 51) Schmidt, C.W. Rinehardt, F.P. and Hearst, J.R. (1971) *Biopolymers* 10, 883 - 895
- 52) Eisenberg, H. in: *Procedures in Nucleic Acid Research*, Vol. 2, (1971) G.L. Cantoni and D.L. Davies, Eds. Harper and Row New York, p. 137 - 152
- 53) Borowkow, A.A. (1976) *Wahrscheinlichkeitstheorie*, Eds. Franken, P. Basel, p. 52
- 54) Stöckl, P. May, R. Strell, I. Hoppe, W. Cejka, Heumann, H. Zillig, W. Cremer, H.L. Katz, J.S. Ibel, K. (1976) *J. Appl. Cryst. Abstracts of 4. Int. Conf. on small angle X-Ray and neutron scattering*
- 55) Zillig, W. Fuchs, E. und Millette, R.L. (1966) *Proc. Nucl. Acid. Res.* 1, 323 - 328
- 56) Pouget, J. and Sadron, C. (1954). *Trans. Faraday Soc.* 50, 303 - 308
- 57) Doty, P. and Edsall, J.T. (1951) *Adv. Protein Chem.* 6, 35 - 49
- 58) Richardson, J. (1970) *Nature* 225, 1109 - 1112
- 59) Davis, R. und Hyman, R. (1970) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 35, 269 - 281
- 60) Schäfer, R. und Zillig, W. (1975) *Eur. Biochem.* 53, 215 - 226.

- 61) Finkley, J. and Fribnow, I. (1975) J. Mol. Biol. 77, 255 -277
- 62) Dunn, J.J. and Studier, F.W. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 1559 -1561
- 63) Dunn, J.J. and Studier, F.W. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 3296 -3299
- 64) Stahl, S.J. and Chamberlin, M.J. (1977) Mol. Biol. 112, 577-601
- 65) Berthsen, (1974) Physik, Springer Verlag, Berlin p. 68
- 66) Kendrick, J., Lettrami, L. & Burgess R. (1976) RNA-Polymerase ed. Lesick, R. & Chamberlin, M. Cold Spring Harb. Laboratory
- 67) Heschel, R. (1971) Dr. Arbeit, Universität, München
- 68) Le. Skaer, J. & Jeanteur, Ph. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 2911 -2922
- 69) Le. Skaer, J. & Jeanteur (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 3111 - 3114
- 70) Smith, T.A., Holmes, A.M., Kliff, R.L., Williams, D.L., Hayes, F.M. (1967) Biochemistry, 6, 3057 -3064
- 71) Sippel, A., Hartmann, G., (1968) Biochim. Biophys. Acta 157, 218-225
- 72) Gys, E. und Wahrli (1976) And. Biochem. 70, 547 -553
- 73) Scherl, M. (1977) Eur. J. Biochem. 80, 325 -330
- 74) Förster, T. (1949) Ann. Physik, 2
- 75) Burstein, D.A., Vedenking, J.S. und Ivanow, M.N. (1973) Photochem. und Photobiol. 18, 263 -279
- 76) Gilman, W. und Scherl, M. und Hiltwachs, H.J. (1970) Hoppe Seyler's Z. phys. Chem. 351, 221 - 227
- 77) Burgess, R.R. & Towner, A.A. (1971) Methods in enzymology (ed. L. Grossmann & K. Moras) Vol. 21D, p. 500, Acad. Press, N.Yor
- 78) Rabussay, D. (1970) Thesis, München
- 79) Maggi, N., Pasqualucci, L.R., Gallotta, R. & Senci, F. (1966) Chemotherapie 11, 205 -208
- 80) Patai, F. & Elving H.G. (1959) Naturwissenschaft 46, 322 - 328
- 81) Quast, U., Angel, J., Heumann, T., Krase, G. and Steffen, E. (1974) E. Biochem. 13, 2512 -2523
- 82) Ibel, K., (1976) J. Appl. Christallogr. 9, 296 - 309
- 83) Fugini, A. & Lurek, J. and J. Letters (1975) 35, 242 -244

- 84) Darlix, J.h., Sent^{en}mac, A. und Fromageot, P, (1968)
Biochim. Biophys. Acta 166, 438 - 451
- 85) Richardson, J.P. (1966) Biochem. 55, 1616 -1623
- 86) Lill und Hartmann pers. Mitteilung
- 87) Marquardt, D.L., (1963), J.Soc. Indust. Appl. Math., 2,
431 - 441
- 88) Rexer, B., pers. Mitteilung
- 89) Mangel, W.F. und Chamberlin, M.J., (1973) J. Biol. Chem. 249,
2995 - 3001
- 90) Kirby, K.S. (1968) Methods Enzymol. 12B, 81-99
- 91) Studier, F.W. (1973) J. Mol. Biol. 79, 237 - 248 und
pers. Mitteilung
- 92) Udenfriend, S., (1969) in Fluorescence Assay p. 50
Academic press, New York
- 93) Wellauer, P., und Dawid, J., (1973) Cold Spr. Harb. Sym.
Quant. Biol. 38, 525 -535
- 94) Schulz, W., pers. Mitteilung

Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name: Hermann Heiko Heumann,
geb. am 21.8.1944 in Danzig

Eltern: Eberhard Heumann, Dipl.Ing.
Helge Heumann, geb. Waldow

Heirat: Januar 1968 mit Ruth Heumann,
geb. Langmann, Sekretärin

Kinder: Klaus Heumann, geb. 16.6.1968
Ursula Heumann, geb. 28.1.1971
Andreas Heumann, geb. 15.11.1973

Schulbildung:

1951-1952 Besuch der Volksschule in Türkenfeld

1952-1954 Besuch der Volksschule in München

1955-1960 Besuch des Hum.Gymnasiums in Fürstenfeldbruck

1961-1964 Besuch des Wilhelmsgymnasiums in München

1964 Abitur

Bundeswehr:

1964-1966

Studium:

1966-1971 Studium der Physik an der TU München

1971-1972 Diplomarbeit bei Professor Dr.J.Engel am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München.
Thema der Arbeit: "Bindung von Kallikrein-Trypsin-Inhibitor an Chymotrypsin"

1972-1978 Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, unter Anleitung von Professor Dr. W.Zillig

